

(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 283 840 A5**



Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz
der DDR vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 15/75
C 12 N 1/20
A 01 N 63/00

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 328 670 3	(22)	17. 05. 89	(44)	24. 10. 90
(31)	1946/88-5	(32)	20. 05. 88	(33)	CH
	3279/88-2		02. 09. 88		
	180/89-8		20. 01. 89		

(71) siehe (73)
(72) Schurter, Walter, Dr. CH; Geiser, Martin, Dr. CH; Mathé, Danièle, FR
(73) CIBA-GEIGY AG, Basel, CH
(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) **Verfahren zur direkten, zielgerichteten und reproduzierbaren genetischen Manipulation von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* unter Verwendung der rekombinanten DNA-Technologie**

(55) Verfahren; Manipulation; *B. thuringiensis*; *B. cereus*; rekombinante DNA-Technologie; Transformationsverfahren
(57) Die Erfindung betrifft Verfahren zur direkten, zielgerichteten und reproduzierbaren genetischen Manipulation von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* unter Verwendung der rekombinanten DNA Technologie. Mit der Erfindung wird ein neuartiges Verfahren zur Verfügung gestellt, bei dem einfache, zum Teil bekannte Verfahrensschritte zur Anwendung kommen. Das Verfahren besteht darin, daß man *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* mit Hilfe eines einfachen Transformationsverfahrens mit hoher Effizienz transformiert unter Verwendung einer rekombinanten DNA, die für die vorgesehene genetische Manipulation von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* geeignet ist.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur direkten, zielgerichteten und reproduzierbaren genetischen Manipulation von **B. thuringiensis** und/oder **B. cereus** unter Verwendung der rekombinanten DNA Technologie, **dadurch gekennzeichnet**, daß man **B. thuringiensis** und/oder **B. cereus** mit Hilfe eines einfachen Transformationsverfahrens mit hoher Effizienz transformiert unter Verwendung einer rekombinierten DNA, die für die vorgesehene genetische Manipulation von **B. thuringiensis** und/oder **B. cereus** geeignet ist.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Transformation von **B. thuringiensis** und/oder **B. cereus** mit Hilfe einer Elektroporation durchführt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Transformation von **B. thuringiensis** und/oder **B. cereus** die folgenden Verfahrensmaßnahmen umfaßt:
 - a) Herstellen einer Zellsuspension mit geeigneter Zelldichte in einem für die Anzucht von **B. thuringiensis** und/oder **B. cereus**-Zellen geeigneten Kultivierungsmedium und bei einer für das Wachstum der Zellen ausreichenden Belüftung;
 - b) Abtrennen der Zellen aus der Zellsuspension und resuspendieren in einem für die nachfolgende Elektroporation geeigneten Inokulationspuffer;
 - c) Zugabe einer DNA-Probe in einer für die Elektroporation geeigneten Konzentration;
 - d) Einbringen des unter Punkt b) und c) beschriebenen Ansatzes in eine Elektroporationsapparatur;
 - e) Eine oder mehrere kurzzeitige Entladungen eines Kondensators über die Zellsuspension zur kurzfristigen Erzeugung hoher elektrischer Feldstärken über einen Zeitraum, der für eine Transformation von **B. thuringiensis** und/oder **B. cereus** Zellen mit rekombinanter DNA ausreichend ist;
 - f) gegebenenfalls Nachinkubation der elektroporierten Zellen;
 - g) Ausplattieren der elektroporierten Zellen auf einem geeigneten Selektionsmedium; und
 - h) Auslesen der transformierten Zellen.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zur Herstellung der unter Punkt 3a) genannten Zellsuspension **B. thuringiensis** Sporen verwendet.
5. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man bei der unter Punkt 3e) genannten Elektroporation tiefgefrorene **Bacillus thuringiensis** und/oder **Bacillus cereus** Zellen verwendet.
6. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man für die Kultivierung von **B. thuringiensis** Zellen
 - a) komplexe Nährmedien mit leicht assimilierbarer Kohlenstoff- und Stickstoffquelle verwendet, wie sie üblicherweise für die Kultivierung von aeroben **Bacillus**-Arten eingesetzt werden;
 - a₁) gegebenenfalls zu den unter a) genannten Medien zusätzlich Vitamine und essentielle Metallionen zusetzt; oder
 - b) voll- oder halbsynthetische Nährmedien verwendet, die
 - b₁) eine komplexe oder aber eine definierte leicht assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquelle oder eine Kombination beider sowie
 - b₂) essentielle Vitamine und Metallionen enthalten.
7. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagte **Bacillus**-Zellsuspension eine optische Dichte von 0,1 bis 1,0 aufweist.
8. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der unter Punkt b) genannte Inokulationspuffer ein osmotisch stabilisierter Phosphatpuffer ist.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagter Phosphatpuffer als stabilisierendes Agens Zucker oder Zuckeralkohole enthält.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagtem stabilisierendem Agens um Saccharose handelt, die in einer Konzentration von 0,1 M bis 1,0 M vorliegt.
11. Verfahren gemäß Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagter Phosphatpuffer einen pH-Wert von pH 5,0 bis pH 8,0 aufweist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Inkubation der **Bacillus**-Zellen sowohl vor, während als auch nach der Elektroporation bei einer Temperatur zwischen 0°C und 35°C erfolgt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Inkubation der **Bacillus**-Zellen sowohl vor, während als auch nach der Elektroporation bei einer Temperatur zwischen 2°C und 15°C erfolgt.

14. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration der zugegebenen DNA-Probe 1 ng bis 20 µg beträgt.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagter DNA-Probe um Vektor-DNA handelt.
16. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man im Zuge der Elektroporation die Bakterienzellen durch kurzzeitige Entladungen eines Kondensators über die DNA-haltige Zellsuspension kurzfristig mit einer sehr hohen elektrischen Feldstärke beaufschlagt, wodurch die Permeabilität der *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* Zellen in einer Weise erhöht wird, daß die Aufnahme der in der Suspension befindlichen DNA in die *Bacillus* Zellen erfolgt.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Feldstärkewerte 100 V/cm bis 50000 V/cm betragen.
18. Verfahren gemäß Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Feldstärkewerte 100 V/cm bis 10000V/cm betragen.
19. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die exponentielle Abklingzeit des Impulses, mit dem die *Bacillus*-Zellsuspension beaufschlagt wird, in einem Bereich von etwa 2 ms und etwa 50 ms liegt.
20. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die elektroporierten Zellen nach einer geeigneten Nachinkubationsphase auf Festmedien ausplattiert, die einen für die Selektionierung der transformierten *Bacillus* Zellen geeigneten Zusatz enthalten.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagtem Zusatz um ein für die Selektion von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* geeignetes Antibiotikum ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tetrazyklin, Kanamycin, Chloramphenicol, Erythromycin handelt.
22. Verfahren gemäß Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagtem Zusatz um ein für die Selektion von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* geeignetes chromogenes Substrat handelt.
23. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zur Transformation von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* verwendete, rekombinante DNA homologen oder heterologen Ursprungs ist oder es sich um eine Kombination aus homologer und heterologer DNA handelt.
24. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagte rekombinante DNA ein oder mehrere Strukturgene sowie 3'- und 5' flankierende, in *Bacillus thuringiensis* oder *Bacillus cereus* oder in beiden funktionsfähige, regulatorische Sequenzen enthält, die in operabler Weise mit dem (den) Strukturgen(en) verknüpft sind und somit die Expression besagten(r) Strukturgen(s) in *Bacillus thuringiensis* oder *Bacillus cereus* oder in beiden gewährleisten.
25. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagtes Strukturgen ein δ -Endotoxin-Polypeptid kodiert, das natürlicherweise in *B. thuringiensis* vorkommt oder aber ein Polypeptid, das diesem im wesentlichen homolog ist, d. h. das zumindest im wesentlichen die Toxizitätseigenschaften eines kristallinen δ -Endotoxin-Polypeptids aus *B. thuringiensis* aufweist.
26. Verfahren gemäß Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagte δ -Endotoxin-kodierende DNA-Sequenz im wesentlichen wenigstens dem Teil oder den Teilchen der natürlichen δ -Endotoxin-kodierenden Sequenz homolog ist, der (die) für die insektizide Aktivität verantwortlich ist (sind).
27. Verfahren gemäß Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagter DNA um Vektor-DNA handelt.
28. Verfahren gemäß Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, daß sich besagte Vektor-DNA von Plasmid DNA ableitet.
29. Verfahren gemäß Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, daß sich besagte Vektor DNA von Phagen DNA ableitet.
30. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man für die Transformation bifunktionelle Vektoren verwendet, die in der Lage sind, außer in *B. thuringiensis* oder dem nahe verwandten *B. cereus* oder in beiden zumindest noch in einem oder aber in mehreren anderen heterologen Wirtsorganismen zu replizieren und die sowohl in den homologen als auch in den heterologen Wirtssystemen identifizierbar sind.
31. Verfahren gemäß Anspruch 30, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagten heterologen Wirtsorganismen um
 - a) prokaryontische Organismen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Gattungen *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Erwinia*, usw., oder
 - b) eukaryontische Organismen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Hefe, tierischen und pflanzlichen Zellen, usw. handelt.

32. Verfahren gemäß Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagtem heterologen Wirtsorganismus um *E. coli* handelt.
33. Verfahren gemäß Anspruch 30, **dadurch gekennzeichnet**, daß man *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* mit einem bifunktionellen Vektor transformiert, der nach einem Verfahren hergestellt ist, das durch die folgenden Verfahrensschritte gekennzeichnet ist:
 - a) Fragmentierung von Plasmid DNA homologen sowie heterologen Ursprungs mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme; und
 - b) anschließend Verknüpfung derjenigen Fragmente, welche die für die Replikation sowie die Selektionierung in dem jeweiligen gewünschten Wirtssystem essentiellen Funktionen enthalten, in Gegenwart geeigneter Enzyme und zwar in einer Weise, daß die für die Replikation und Selektion in den verschiedenen Wirtssystemen essentiellen Funktionen erhalten bleiben.
34. Verfahren gemäß Anspruch 33, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Plasmid DNA rein heterologen Ursprungs verwendet.
35. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 33 oder 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagter
 - a) homologer Plasmid DNA um DNA handelt, die natürlicherweise in *Bacillus thuringiensis* oder *B. cereus* vorliegt oder aber dieser im wesentlichen homolog ist,
 - b) heterologer Plasmid DNA um DNA handelt, die natürlicherweise in
 - b₁) prokaryontischen Organismen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Gattungen **Bacillus, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces, Pseudomonas, Escherichia, Agrobacterium, Salmonella, Erwinia**, usw.,
 - b₂) eukaryontischen Organismen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Hefe, tierischen und pflanzlichen Zellen usw.vorliegt oder aber dieser im wesentlichen homolog ist.
36. Verfahren gemäß Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagter heterologer Plasmid DNA um eine DNA handelt, die natürlicherweise in *E. coli* vorliegt oder aber dieser im wesentlichen homolog ist.
37. Verfahren gemäß Anspruch 33, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagte bifunktionelle Vektoren neben den für die Replikation und Selektion in homologen und heterologen Wirtssystemen essentiellen Funktionen zusätzlich noch ein oder mehrere Gen(e) in exprimierbarer Form oder sonstige nützliche DNA-Sequenzen besitzen, die man mit Hilfe geeigneter Enzyme in besagte bifunktionelle Vektoren einspleißt.
38. Verfahren gemäß Anspruch 37, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagte Gene oder sonstige nützliche DNA Sequenzen homologen, heterologen oder synthetischen Ursprungs sind oder aber aus einer Kombination besagter Gene oder DNA-Sequenzen bestehen.
39. Verfahren gemäß Anspruch 37, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagte Gene aus einem oder mehreren Strukturgenen sowie aus 3' und 5' flankierenden, in *B. thuringiensis* oder *B. cereus* oder in beiden funktionsfähigen regulatorischen Sequenzen bestehen, die in operabler Weise mit dem Strukturgen verknüpft sind und somit die Expression besagten Strukturgens in *B. thuringiensis* oder *B. cereus* oder in beiden gewährleisten.
40. Verfahren gemäß Anspruch 39, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagten regulatorischen Sequenzen um Expressionssignale handelt, die sowohl Promotor- als auch Terminatorsequenzen sowie weitere regulatorische Sequenzen der 3' und 5' nichttranslatierten Regionen miteinander schließen.
41. Verfahren gemäß Anspruch 40, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagte Expressionssignale natürlicherweise in *B. thuringiensis* oder in *B. cereus* oder in beiden vorkommen oder daß es sich um Mutanten und Varianten dieser natürlichen Expressionssignale handelt, die der natürlichen Sequenz im wesentlichen homolog sind.
42. Verfahren gemäß Anspruch 41, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagte Expressionssignale einen Sporulations-abhängigen Promotor aus *B. thuringiensis* miteinschließen.
43. Verfahren gemäß Anspruch 39, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagtes Strukturgen ein δ -Endotoxin-Polypeptid kodiert, das natürlicherweise in *B. thuringiensis* vorkommt oder aber ein Polypeptid, das diesem im wesentlichen homolog ist, d. h. das zumindest im wesentlichen die Toxizitätseigenschaften eines kristallinen δ -Endotoxin Polypeptids aus *B. thuringiensis* aufweist.
44. Verfahren gemäß Anspruch 39, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagtem Strukturgen um eine natürlicherweise in *B. thuringiensis* vorkommende, δ -Endotoxin kodierende DNA-Sequenz handelt oder aber um eine Variante einer natürlichen DNA-Sequenz, die der entsprechenden natürlichen Sequenz zumindest im wesentlichen homolog ist.

45. Verfahren gemäß Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß besagtes Polypeptid einem δ -Endotoxin-Polypeptid aus geeigneten Unterarten von *B. thuringiensis*, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *kurstaki*, *berliner*, *alesti*, *sotto*, *tolworthi*, *dendrolimus*, *tenebrionis* und *israelensis* im wesentlichen homolog ist.
46. Verfahren gemäß Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß besagte δ -Endotoxin kodierende DNA Sequenz im wesentlichen wenigstens dem Teil oder den Teilen der natürlichen δ -Endotoxin kodierenden Sequenz homolog ist, der (die) für die insektizide Aktivität verantwortlich ist (sind).
47. Verfahren gemäß Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei besagter δ -Endotoxin kodierender DNA Sequenz um ein DNA Fragment aus *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HDI handelt, das sich zwischen den Nukleotiden 156 und 3623 in Formel I befindet oder aber um jedes beliebige kürzere DNA-Fragment, das noch ein Polypeptid mit insektentoxischen Eigenschaften kodiert:

Formel I

10	20	30	40	50	60
GTTAACACCC	TGGGTCAAAA	ATTGATATTT	AGTAAAATTA	GTTGCACTTT	GTGCATTTTT
70	80	90	100	110	120
TCATAAGATG	AGTCATATG1	TTTAAATTGT	AGTAATGAAA	AACAGTATTA	TATCATAATG
130	140	150	160	170	180
AATTGGTATC	TTAATAAAAG	AGATGGAGGT	AACTTATGGA	TAACAATCCG	AACATCAATG
190	200	210	220	230	240
AATGCATTCC	TTATAATTGT	TTAAGTAACC	CTGAAGTAGA	AGTATTAGGT	GGAGAAAGAA
250	260	270	280	290	300
TAGAAACTGG	TTACACCCCA	ATCGATATTT	CCTTGTCGCT	AACGCAATTT	CTTTTGAGTG
310	320	330	340	350	360
AATTTGTTCC	CGGTGCTGGA	TTTGTGTTAG	GACTAGTTGA	TATAATATGG	GGAATTTTTG
370	380	390	400	410	420
GTCCCTCTCA	ATGGGACGCA	TTTCTTGTC	AAATTGAACA	GTTAATTAAC	CAAAGAATAG
430	440	450	460	470	480
AAGAATTCGC	TAGGAACCAA	GCCATTTCTA	GATTAGAAGG	ACTAAGCAAT	CTTTATCAAA
490	500	510	520	530	540
TTTACGCAGA	ATCTTTTAGA	GAGTGGGAAG	CAGATCCTAC	TAATCCAGCA	TTAAGAGAAG
550	560	570	580	590	600
AGATGCCGTAT	TCAATTCAAT	GACATGAACA	GTGCCCTTAC	AACCGCTATT	CCTCTTTTTG

610 620 630 640 650 660
CAGTTCAAAA TTATCAAGTT CCTCTTTTAT CAGTATATGT TCAAGCTGCA AATTACATT

670 680 690 700 710 720
TATCAGTTTT GAGAGATGTT TCAGTGTTTG GACAAAGGTG CCGATTGAT GCCGCGACTA

730 740 750 760 770 780
TCAATAGTCG TTATAATGAT TTAAGTAGGC TTATTGGCAA CTATACAGAT CATGCTGTAC

790 800 810 820 830 840
GCTGGTACAA TACGGGATTA GAGCGTGAT GGGGACCGGA TTCTAGAGAT TGGATAAGAT

850 860 870 880 890 900
ATAATCAATT TAGAAGAGAA TTAACACTAA CTGTATTAGA TATCGTTTCT CTATTCCGA

910 920 930 940 950 960
ACTATGATAG TAGAACGTAT CCAATTGCAA CAGTTTCCCA ATTAACAAGA GAAATTTATA

970 980 990 1000 1010 1020
CAAACCCAGT ATTAGAAAAT TTTGATGGTA GTTTTGAGG CTCGGCTCAG GGCATAGAAG

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GAAGTATTAG GAGTCCACAT TTGATGGATA TACTTAACAG TATAACCATC TATACGGATG

1090 1100 1110 1120 1130 1140
CTCATAGAGG AGAATATTAT TGGTCAGGGC ATCAAATAAT GGCTTCTCCT GTAGGGTTTT

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CGGGGCCAGA ATTCACTTTT CCGCTATATG GAACTATGGG AAATGCAGCT CCACAACAAC

1210 1220 1230 1240 1250 1260
GTATTGTTGC TCAACTAGGT CAGGGCGTGT ATAGAACATT ATCGTCCACT TTATATAGAA

1270 1280 1290 1300 1310 1320
GACCTTTTAA TATAGGGATA AATAATCAAC AACTATCTGT TCTTGACGGG ACAGAATTTG

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CTTATGGAAC CTCCTCAAAT TTGCCATCCG CTGTATACAG AAAAAAGCGGA ACGGTAGATT

1390 1400 1410 1420 1430 1440
CGCTGGATGA AATACCGCCA CAGAATAACA ACGTGCCACC TAGGCAAGGA TTAGTCATC

1450 1460 1470 1480 1490 1500
GATTAAGCCA TGTTTCAATG TITCGTTCAG GCTTTAGTAA TAGTAGTGTA AGTATAATAA

1510 1520 1530 1540 1550 1560
GAGCTCCTAT GTTCTCTTGG ATACATCGTA GTGCTGAATT TAATAATATA ATTCCTTCAT

1570 1580 1590 1600 1610 1620
CACAAATTAC ACAAATACCT TTAACAAAAT CTACTAATCT TGGCTCTGGA ACTTCTGTCC

1630 1640 1650 1660 1670 1680
TTAAAGGACC AGGATTTACA GGAGGAGATA TTCTTCGAAG AACTTCACCT GGCCAGATTT

1690 1700 1710 1720 1730 1740
CAACCTTAAG AGTAAATATT ACTGCACCAT TATCACAAAG ATATCGGGTA AGAATTGCTT

1750 1760 1770 1780 1790 1800
ACGCTTCTAC CACAAATTTA CAATTCCATA CATCAATTGA CGGAAGACCT ATTAATCAGG

1810 1820 1830 1840 1850 1860
GGAATTTTTT AGCAACTATG AGTAGTGGGA GTAATTTACA GTCCGGAAGC TTTAGGACTG

1870 1880 1890 1900 1910 1920
TAGGTTTTAC TACTCCGTTT AACTTTTCAA ATGGATCAAG TGTATTTACG TTAAGTGCTC

1930 1940 1950 1960 1970 1980
ATGTCTTCAA TTCAGGCAAT GAAGTTTATA TAGATCGAAT TGAATTTGTT CCGGCAGAAG

1990 2000 2010 2020 2030 2040
TAACCTTTGA GGCAGAATAT GATTTAGAAA GAGCACAAAA GGCGGTGAAT GAGCTGTTTA

2050 2060 2070 2080 2090 2100
CTTCTTCCAA TCAAATCGGG TTA AAAACAG ATGTGACGGA TTATCATATT GATCAAGTAT

2110 2120 2130 2140 2150 2160
CCAATTTAGT TGAGTGTTA TCTGATGAAT TTTGTCTGGA TGAAAAAAAA GAATTGTCCG

2170 2180 2190 2200 2210 2220
AGAAAGTCAA ACATGCGAAG CGACTTAGTG ATGAGCGGAA TTTACTTCAA GATCCAAACT

2230 2240 2250 2260 2270 2280
TTAGAGGGAT CAATAGACAA CTAGACCGTG GCTGGAGAGG AAGTACGGAT ATTACCATCC

2290 2300 2310 2320 2330 2340
AAGGAGGCGA TGACGTATTC AAAGAGAATT ACGTTACGCT ATTGGGTACC TTTGATGAGT

2350 2360 2370 2380 2390 2400
GCTATCCAAC GTATTATAT CAAAAAATAG ATGAGTCGAA ATTA AAAAGCC TATACCCGTT

2410 2420 2430 2440 2450 2460
ACCAATTAAG AGGGTATATC GAAGATAGTC AAGACTTAGA AATCTATTTA ATTGCTACA

2470 2480 2490 2500 2510 2520
ATGCCAAACA CGAAACAGTA AATGTGCCAG GTACGGGTTT CTTATGGCCG CTTTCAGCCC

2530 2540 2550 2560 2570 2580
CAAGTCCAAT CGGAAAATGT GCCCATCATT CCCATCATT CTCCTTGGAC ATTGATGTTG

2590 2600 2610 2620 2630 2640
GATGTACAGA CTAAATGAG GACTTAGGTG TATGGGTGAT ATTCAAGATT AAGACGCAAG

2650 2660 2670 2680 2690 2700
ATGGCCATGC AAGACTAGGA AATCTAGAAT TTCTCGAAGA GAAACCATTA GTAGGAGAAG

2710 2720 2730 2740 2750 2760
CACTAGCTCG TGTGAAAAGA GCGGAGAAAA AATGGAGAGA CAAACGTGAA AAATTGGAAT

2770 2780 2790 2800 2810 2820
GGGAAACAAA TATTGTTTAT AAAGAGGGCAA AAGAATCTGT AGATGCTTTA TTTGTAAACT

2830 2840 2850 2860 2870 2880
CTCAATATGA TAGATTACAA GCGGATACCA ACATCGCGAT GATTCATGCG GCAGATAAAC

2890 2900 2910 2920 2930 2940
GCGTTCATAG CATTGAGAA GCTTATCTGC CTGAGCTGTC TGTGATTCCG GGTGTCAATG

2950 2960 2970 2980 2990 3000
CGGCTATTTT TGAAGAATTA GAAGGGCGTA TTTTACTGCG ATTCTCCCTA TATGATGCCA

3010 3020 3030 3040 3050 3060
GAAATGTCAT TAAAAATGGT GATTTTAATA ATGGCTTATC CTGCTGGAAC GTGAAAGGGC

3070 3080 3090 3100 3110 3120
ATGTAGATGT AGAAGAACAA AACAACCACC GTTCGGTCCT TGTGTGCCG GAATGGGAAG

3130 3140 3150 3160 3170 3180
CAGAAGTGTC ACAAGAAGTT CGTGTCTGTC CGGGTCGTGG CTATATCCTT CGTGTACAG

3190 3200 3210 3220 3230 3240
CGTACAAGGA GGGATATGGA GAAGGTTGCG TAACCATTCA TGAGATCGAG AACAATACAG

3250 3260 3270 3280 3290 3300
ACGAACTGAA GTTTAGCAAC TGTGTAGAAG AGGAAGTATA TCCAAACAAC ACGGTAACGT

3310 3320 3330 3340 3350 3360
GTAATGATTA TACTGCGACT CAAGAAGAAT ATGAGGGTAC GTACACTTCT CGTAATCGAG

3370 3380 3390 3400 3410 3420
GATATGACGG AGCCTATGAA AGCAATTCTT CTGTACCAGC TGATTATGCA TCAGCCTATG

3430 3440 3450 3460 3470 3480
AAGAAAAAGC ATATACAGAT GGACGAAGAG ACAATCCTTG TGAATCTAAC AGAGGATATG

3490 3500 3510 3520 3530 3540
GGGATTACAC ACCACTACCA GCTGGCTATG TGACAAAAGA ATTAGAGTAC TTCCCAGAAA

3550 3560 3570 3580 3590 3600
CCGATAAGGT ATGGATTGAG ATCGGAGAAA CGGAAGGAAC ATTCATCGTG GACAGCGTGG

3610 3620 3630 3640 3650 3660
AATTACTTCT TATGGAGGAA TAATATATGC TTTATAATGT AAGGTGTGCA AATAAAGAAT

3670 3680 3690 3700 3710 3720
GATTACTGAC TTGTATTGAC AGATAAATAA GGAAATTTTT ATATGAATAA AAAACGGGCA

3730 3740 3750 3760 3770 3780
TCACTCTTAA AAGAATGATG TCCGTTTTTT GTATGATTTA ACGAGTGATA TTTAAATGTT

3790 3800 3810 3820 3830 3840
TTTTTTGCCA AGGCTTTACT TAACGGGGTA CCGCCACATG CCCATCAACT TAAGAATTTG

3850 3860 3870 3880 3890 3900
CACTACCCCC AAGTGTCAAA AAACGTTATT CTTTCTAAAA AGCTAGCTAG AAAGGATGAC

3910 3920 3930 3940 3950 3960
ATTTTTTATG AATCTTTCAA TTCAAGATGA ATTACAAC TA TTTTCTGAAG AGCTGTATCG

3970 3980 3990 4000 4010 4020
TCATTTAACC CCTTCTCTTT TGGAAGAACT CGCTAAAGAA TTAGGTTTTG TAAAAAGAAA

4030 4040 4050 4060 4070 4080
ACGAAAGTTT TCAGGAAATG AATTAGCTAC CATATGTATC TGGGGCAGTC AACGTACAGC

4090 4100 4110 4120 4130 4140
GAGTGATTCT CTCGTTGAC TATGCAGTCA ATTACACGCC GCCACAGCAC TCTTATGAGT

4150 4160 4170 4180 4190 4200
CCAGAAGGAC TCAATAAAGC CTTTGATAAA AAAGCGGTG AATTTTTGAA ATATATTTTT

4210 4220 4230 4240 4250 4260
 ICTGCATTAT GGAAAAGTAA ACTTTGTAAG ACATCAGCCA TTCAAGTGC AGCACTCAGG

 4270 4280 4290 4300 4310 4320
 TATTTTCAAC GAATCCGTAT TTTAGATGCG ACGATTTTCC AAGTACCGAA ACATTTAGCA

 4330 4340 4350 4360
 CATGTATATC CTGGGTCAGG TGGTTGTGCA CAAACTGCAG

48. Verfahren gemäß Anspruch 33, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagtem bifunktionellen Vektor um den bifunktionellen Vektor pXI 61 (pK 61) transformiert in *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HDI cryB (DSM 4572) handelt.
49. Verfahren gemäß Anspruch 47, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagtem bifunktionellen Vektor um den bifunktionellen Vektor pXI 93 (pK 93), transformiert in *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HDI cryB (DSM 4571) und *B. cereus* 569K (DSM 4573) handelt.
50. Verfahren zur direkten, zielgerichteten und reproduzierbaren genetischen Manipulation von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - a) Gene, welche in *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* kloniert und gegebenenfalls exprimiert werden sollen, zunächst isoliert;
 - b) die isolierten Gene gegebenenfalls mit Expressionssequenzen, die in *Bacillus thuringiensis* und/oder *B. cereus* funktionsfähig sind, operabel verknüpft;
 - c) die genetischen Konstruktionen aus Abschnitt b) unter Verwendung geeigneter Vektoren in *Bacillus thuringiensis* und/oder *B. cereus* Zellen transformiert; und
 - d) gegebenenfalls ein entsprechendes Genprodukt exprimiert und, sofern gewünscht, isoliert.
51. Verfahren gemäß Anspruch 50, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagtem Gen um ein Protoxigen aus *Bacillus thuringiensis* handelt.
52. Verfahren gemäß Anspruch 50, **dadurch gekennzeichnet**, daß besagte Expressionssequenzen einen Sporulations-abhängigen Promotor aus *Bacillus thuringiensis* miteinschließen.
53. Verfahren gemäß Anspruch 50, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Direktklonierungsvektoren verwendet.
54. Verfahren gemäß Anspruch 50, **dadurch gekennzeichnet**, daß man bifunktionelle („Shuttle“) Vektoren verwendet.
55. Verfahren gemäß Anspruch 50, **dadurch gekennzeichnet**, daß man anstelle von Genen sonstige nützliche DNA-Sequenzen in die *Bacillus* Zellen einschleust und dort kloniert.
56. Verfahren zur direkten, zielgerichteten und reproduzierbaren genetischen Manipulation von *Bacillus thuringiensis* und/oder *B. cereus* gemäß Anspruch 50, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - a) die Gesamt-DNA von *Bacillus thuringiensis* mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme verdaut;
 - b) aus den resultierenden Restriktionsfragmenten solche geeignete Größe isoliert;
 - c) besagte Fragmente in einen geeigneten Vektor einspleißt;
 - d) *Bacillus thuringiensis* und/oder *B. cereus*-Zellen mit besagtem Vektor transformiert; und
 - e) aus den Transformanten mit Hilfe geeigneter Screeningverfahren neue DNA Sequenzen isoliert.
57. Verfahren gemäß Anspruch 56, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagtem neuen Gen um ein Protoxigen handelt.
58. Verfahren gemäß Anspruch 56, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Direktklonierungsvektoren verwendet.
59. Verfahren gemäß Anspruch 56, **dadurch gekennzeichnet**, daß man „Shuttle“ Vektoren verwendet.
60. Verfahren gemäß Anspruch 56, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zum Aufspüren neuer DNA Sequenzen ein immunologisches Screeningverfahren verwendet.
61. Verfahren zur Bekämpfung von Insekten, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Insekten oder deren Lebensraum mit
 - a) *B. thuringiensis* oder *B. cereus*-Zellen oder mit einem Gemisch von beiden behandelt, die mit einem rekombinanten DNA-Molekül transformiert sind, das ein Strukturgen enthält, welches für ein δ -Endotoxin-Polypeptid kodiert, das natürlicherweise in *B. thuringiensis* vorkommt oder aber ein Polypeptid, das diesem im wesentlichen homolog ist; oder aber

- b) mit zellfreien Kristallkörperpräparaten, die ein Protoxin enthalten, das von besagten transformierten *Bacillus*-Zellen produziert wird.
62. Verfahren gemäß Anspruch 57, **dadurch gekennzeichnet**, daß man insektizide Gemische verwendet, bestehend aus transformierten, lebenden oder toten *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* Zellen gemäß Abschnitt a) sowie aus zellfreien Kristallkörperpräparaten, die ein Protoxin enthalten, das von besagten transformierten *Bacillus* Zellen produziert wird, gemäß Abschnitt b).
63. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 61 oder 62, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagtem rekombinanten DNA-Molekül um einen bifunktionellen Vektor gemäß einem der Ansprüche 33 bis 47 handelt.
64. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 61 bis 63, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich um Insekten der Ordnung *Lepidoptera*, *Diptera* oder *Coleoptera* handelt.
65. Verfahren gemäß Anspruch 64, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich um Insekten der Ordnung *Lepidoptera* handelt.
66. Mittel zur Bekämpfung von Insekten, **dadurch gekennzeichnet**, daß es neben den üblicherweise verwendeten Trägermitteln, Verteilungsmitteln oder Träger- und Verteilungsmitteln
- a) *B. thuringiensis* oder *B. cereus* Zellen oder ein Gemisch besagter *Bacillus*-Zellen enthält, die mit einem rekombinanten DNA-Molekül transformiert sind, das ein Strukturgen enthält, welches für ein δ -Endotoxin-Polypeptid kodiert, das natürlicherweise in *B. thuringiensis* vorkommt oder aber ein Polypeptid, das diesen im wesentlichen homolog ist; oder aber
- b) zellfreie Kristallkörperpräparate, die ein Protoxin enthalten, das von besagten transformierten *Bacillus*-Zellen produziert wird.
67. Mittel zur Bekämpfung von Insekten gemäß Anspruch 66, **dadurch gekennzeichnet**, daß es neben den üblicherweise verwendeten Trägermitteln, Verteilungsmitteln oder Träger- und Verteilungsmitteln insektizide Gemische enthält, bestehend aus transformierten, lebenden oder toten *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* Zellen gemäß Abschnitt a) sowie aus zellfreien Kristallkörperpräparaten, die ein Protoxin enthalten, das von besagten transformierten *Bacillus* Zellen produziert wird, gemäß Abschnitt b).
68. Mittel gemäß einem der Ansprüche 66 oder 67, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei besagtem rekombinanten DNA-Molekül um einen bifunktionellen Vektor gemäß einem der Ansprüche 33 bis 47 handelt.
69. Verwendung von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus*, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie als generelle Wirtsorganismen für die Klonierung und Expression homologer sowie insbesondere auch heterologer DNA oder einer Kombination aus homologer und heterologer DNA eingesetzt werden.

Hierzu 9 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren, welches erstmals eine direkte und zielgerichtete genetische Manipulation von *Bacillus thuringiensis* sowie dem nahe verwandten *B. cereus* mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie ermöglicht, basierend auf einem effizienten Transformationsverfahren für besagte *Bacillus*-Spezies.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Konstruktion von Plasmiden und „shuttle“-Vektoren sowie die damit transformierten *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Stämme selbst.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Einschleusung und gegebenenfalls Expression von Genen oder sonstigen nützlichen DNA Sequenzen in *Bacillus thuringiensis* und/oder *Bacillus cereus*, insbesondere aber ein Verfahren zur Einschleusung und Expression von Protoxingenen.

Ebenfalls umfaßt von der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur direkten Klonierung sowie gegebenenfalls zur Expression und Identifizierung neuer Gene oder sonstiger nützlicher DNA-Sequenzen in *Bacillus thuringiensis* und/oder *Bacillus cereus*, wodurch erstmals die Möglichkeit besteht, Genbanken direkt in *Bacillus thuringiensis* und/oder *Bacillus cereus* zu etablieren und dort zu exprimieren.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Bacillus thuringiensis gehört zur großen Gruppe der gram-positiven, aeroben, Endosporen bildenden Bakterien. Im Unterschied zu den sehr nahe verwandten *Bacillus* Arten, *B. cereus* und *B. anthracis*, produziert die Mehrzahl der bisher bekannten *B. thuringiensis*-Spezies im Verlaufe ihrer Sporulation einen paraspolaren Einschlußkörper, der aufgrund seiner kristallinen Struktur allgemein auch als Kristallkörper bezeichnet wird. Dieser Kristallkörper ist aus insektizid wirksamen kristallinen Protoxin-Proteinen, dem sogenannten δ -Endotoxin, zusammengesetzt.

Diese Proteinkristalle sind für die Insektentoxizität von *B. thuringiensis* verantwortlich. Das δ -Endotoxin entfaltet seine insektizide Aktivität jedoch erst nach der oralen Aufnahme des Kristallkörpers und dessen Auflösung in alkalischen Darmsaft der Zielinsekten sowie der Freisetzung der eigentlichen toxischen Komponente aus dem Protoxin durch limitierte Proteolyse aufgrund der Einwirkung von Proteasen aus dem Verdauungstrakt der Insekten.

Die δ -Endotoxine der verschiedenen *B. thuringiensis*-Stämme zeichnen sich durch ihre hohe Spezifität gegenüber bestimmten Zielinsekten, insbesondere gegenüber verschiedenen Lepidopteren-, Coleopteren- und Dipterenlarven sowie durch ihre große Wirksamkeit aus. Weitere Vorteile, die bei der Verwendung der δ -Endotoxine von *B. thuringiensis* eine Rolle spielen, liegen in der offensichtlichen Schwierigkeit für die Zielinsekten begründet, Resistenzen gegen das kristalline Protein zu entwickeln, sowie in der Unschädlichkeit der Toxine gegenüber Menschen, anderen Säugetieren, Vögeln, Fischen oder Insekten, mit Ausnahme der oben genannten Zielinsekten.

Das insektizide Potential der *B. thuringiensis*-Protoxine wurde schon sehr früh erkannt. Bereits seit Ende der 20er Jahre werden *B. thuringiensis*-Präparate als Bioinsektizide zur Bekämpfung verschiedener, durch Insekten verursachter Erkrankungen von Kulturpflanzen eingesetzt. Mit der Entdeckung von *B. thuringiensis* var. *israelensis* durch Goldberg/1/ and Margalit (1977) sowie *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* durch Krieg/2/ et al (1983) konnte das Anwendungsspektrum von *B. thuringiensis* sogar auf Mücken- und Käferlarven ausgedehnt werden.

Mit der Einführung der Gentechnologie und den sich daraus ergebenden neuen Möglichkeiten hat das Gebiet der *B. thuringiensis*-Toxine einen neuen Aufschwung erfahren.

So gehört die Klonierung von δ -Endotoxingenen in fremden Wirtsorganismen wie beispielsweise in *E. coli* bereits zur Routine. Das hat dazu geführt, daß mittlerweile die DNA-Sequenzen einer ganzen Reihe von δ -Endotoxingenen bekannt sind (z. B. Schnepf, H. E./3/ and Whitley, H. R., 1981; Klier, A./4/ et al, 1982; Geiser, M./5/ et al, 1986; Haider, M. Z./6/ et al, 1987).

Die meisten *B. thuringiensis*-Arten enthalten mehrere Gene, die ein insektizid wirksames Protein kodieren. Diese Gene, die nur während der Sporulationsphase exprimiert werden, sind in der Mehrzahl der Fälle auf großen übertragbaren Plasmiden (30 bis 150 Md) lokalisiert und können daher sehr einfach zwischen den verschiedenen *B. thuringiensis*-Stämmen sowie zwischen *B. thuringiensis* und *B. cereus* ausgetauscht werden, sofern diese kompatibel sind (Gonzalez, J. M./7/ et al, 1982).

Die Protoxingene von *B. thuringiensis* var. *kurstaki* gehören zu einer Familie verwandter Gene, von denen verschiedene bereits kloniert und sequenziert wurden. Diese Arbeiten wurden in erster Linie in einem *E. coli*-Klonierungssystem durchgeführt.

Die Klonierung von *B. thuringiensis*-Genen war somit bisher im wesentlichen auf einige wenige und ausschließlich heterologe Wirtssysteme beschränkt, von denen das *E. coli*-System das am besten untersuchte und verstandene ist.

Mittlerweile sind jedoch auch Berichte über eine erfolgreiche Klonierung und Expression von Protoxingenen in anderen Wirtssystemen bekannt geworden, wie z. B. in *B. subtilis* (Klier, A./4/ et al, 1982), *Pseudomonas fluorescens* (Obukowicz, M. G./8/ et al, 1986), sowie *Saccharomyces cerevisiae* (EP 0238441). Auch der Einbau und die Expression des δ -Endotoxingenes in pflanzliche Wirtszellen sind inzwischen geglückt (EP 0292435).

Bei der Klonierung in *E. coli* wird die Tatsache ausgenutzt, daß manche Protoxingene zusätzlich zu den gram-positiven Promotoren zufälligerweise auch einen *E. coli*-ähnlichen Promotor enthalten. Diese promotorähnlichen DNA-Sequenzen machen es möglich, daß die *B. thuringiensis* Protoxingene auch in heterologen Wirtssystemen exprimiert werden können, sofern diese in der Lage sind, die oben erwähnten Kontrollsequenzen zu erkennen.

Die exprimierten Protoxinproteine können dann, nach Aufbrechen der Wirtszellen, mit Hilfe bekannter Verfahren isoliert und identifiziert werden.

Es hat sich zwischenzeitlich aber gezeigt, daß nicht in allen Fällen *E. coli*-ähnliche Promotoren in Protoxingenen vorhanden sind (Donovan/9/ et al, 1988), so daß bisher nur ganz bestimmte Protoxingene, welche die zuvor genannten Voraussetzungen erfüllen, in heterologen Wirtssystemen exprimierbar und damit identifizierbar sind.

Die Klonierung von Genen außerhalb des natürlichen Wirtsorganismus sowie die Verwendung dieser Stämme in der Praxis als Bioinsektizide sind somit mit einer Reihe zum Teil gravierender Nachteile verbunden:

- a) Eine Expression von *B. thuringiensis*-Protoxingenen ist nur in bestimmten Fällen möglich.
- b) Es erfolgt im allgemeinen keine oder aber nur eine geringe Sekretion von exprimierten Fremdproteinen.
- c) Eine korrekte Faltung der δ -Endotoxine ist im reduzierenden Milieu von heterologen Wirtszellen nicht immer gewährleistet, was eine unerwünschte Änderung der spezifischen Aktivität oder des Wirkungsbereiches der Toxine zur Folge haben kann.
- d) Falls eine Expression überhaupt stattfindet, so sind die Expressionsraten der klonierten Fremdgene unter den nativen Expressionssequenzen zumeist nur gering.

Schnepf/3/ und Whitley/10/ (1981; 1985) schätzen, daß das in *E. coli* klonierte *B. thuringiensis*-Toxin nur 0,5% bis 1% des gesamten Zellproteins von *E. coli* ausmacht, wohingegen das Kristallprotein in *B. thuringiensis* zwischen 30% und 40% des Trockengewichts sporulierender Kulturen beträgt. Diese gravierenden Unterschiede in den Expressionsraten sind möglicherweise auf das Fehlen von sporulationsspezifischen Kontrollsignalen in den heterologen Wirtssystemen sowie auf Schwierigkeiten bei der Erkennung der *B. thuringiensis*-Promotoren und/oder Problemen bei der posttranslationalen Modifikation des Toxinmoleküls durch den Fremdwirt zurückzuführen.

e) Viele der allgemein zur Expression verwendeten Wirtsstämme sind toxikologisch nicht so unbedenklich wie *B. thuringiensis* und *B. cereus*.

f) *B. thuringiensis* und *B. cereus* bilden einen natürlichen Hauptbestandteil der mikrobiellen Bodenflora, was für die meisten der allgemein zur Expression verwendeten Wirtsstämme nicht zutrifft.

Diese zuvor genannten Probleme und Schwierigkeiten könnten überwunden werden, wenn es gelänge, besagte *B. thuringiensis*-Gene direkt im homologen Wirtssystem zu klonieren, wo die natürlichen gram-positiven Promotoren der Protoxingene zur Expression benützt werden können.

Es existiert aber bisher kein Verfahren, das *B. thuringiensis*, dieses aus kommerzieller Sicht so wichtige Bakterium, einer direkten genetischen Modifizierbarkeit zugänglich macht und damit beispielsweise eine effiziente Wiedereinschleusung eines klonierten Protoxingens in einen *B. thuringiensis*-Stamm ermöglicht.

Der Grund hierfür ist in erster Linie darin zu sehen, daß es bisher nicht gelungen ist, ein effizientes Transformationssystem für *B. thuringiensis* sowie den nahe verwandten *B. cereus* zu entwickeln, welches hinreichend hohe Transformationsraten gewährleistet und somit die Anwendung bereits etablierter rDNA-Techniken auch auf *B. thuringiensis* ermöglicht.

Die bisher verwendeten Verfahren zur Herstellung neuer *B. thuringiensis*-Stämme mit neuen insektiziden Eigenschaften basieren vornehmlich auf dem konjugalen Transfer von Plasmid kodierten Protoxingenen.

Eine erfolgreiche Wiedereinschleusung eines klonierten *B. thuringiensis*-Kristallproteingens in *B. thuringiensis* ist bisher erst in einem einzigen Fall beschrieben (Klier, A./11/ et al, 1983), wobei aber auch hier, in Ermangelung eines geeigneten Transformationssystems für *B. thuringiensis*, auf den konjugalen Transfer zwischen *B. subtilis* und *B. thuringiensis* zurückgegriffen werden mußte. Auch bei diesem von Klier et al beschriebenen Verfahren wird *E. coli* als Zwischenwirt verwendet.

Die konjugalen Transfer-Verfahren weisen jedoch eine ganze Reihe von gravierenden Nachteilen auf, die sie für eine routinemäßige Anwendung zur genetischen Modifikation von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* ungeeignet erscheinen lassen.

- a) Der konjugale Transfer von Plasmid kodierten Protoxingenen ist nur zwischen *B. thuringiensis*-Stämmen bzw. zwischen *B. cereus* und *B. thuringiensis*-Stämmen möglich, die kompatibel miteinander sind.
- b) Bei konjugalem Plasmidtransfer zwischen weiter entfernten Stämmen wird häufig nur eine geringe Transferfrequenz erzielt.
- c) Es gibt keine Möglichkeit, die Expression der Protoxingene zu regulieren oder zu modifizieren.
- d) Es gibt keine Möglichkeit, das Gen selbst zu modifizieren.
- e) Bei Anwesenheit mehrerer Protoxingene in einem Stamm kann die Expression einzelner Gene aufgrund des sog. Gen-Dosis-Effektes stark reduziert sein.
- f) Es kann zum Auftreten von Instabilitäten kommen aufgrund einer möglichen homologen Rekombination verwandter Protoxingene.

Alternative Transformationsverfahren, die beispielsweise bei vielen grampositiven Organismen mittlerweile routinemäßig Anwendung finden, erwiesen sich sowohl bei *B. thuringiensis* als auch bei *B. cereus* als ungeeignet.

Zu den vorgenannten Verfahren gehört z. B. die direkte Transformation von Bakterienprotoplasten mit Hilfe der Polyethylenglykolbehandlung, die bei vielen *Streptomyces*-Stämmen (Bibb, J.J./12/ et al, 1978) sowie bei *B. subtilis* (Chang, S., and Cohen, S.N./3/ 1979), *B. megaterium* (Brown, B.J., and Carlton, B.C./14/ 1980), *Streptococcus lactis* (Kondo, J.K., and McKay, L.L./15/ 1984), *S. faecalis* (Wirth, R./16/ et al), *Corynebacterium glutamicum* (Yoshihama, M./17/ et al, 1985) sowie zahlreichen anderen gram-positiven Bakterien erfolgreich angewendet wurde.

Für die Anwendung dieses Verfahrens müssen die Bakterienzellen zunächst protoplastisiert werden, d. h., die Zellwände werden mit Hilfe lytischer Enzyme verdaut.

Eine weitere Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung dieses direkten Transformationsverfahrens bilden die Expression der neu eingeführten genetischen Information sowie die Regeneration der transformierten Protoplasten auf komplexen Festmedien, bevor eine erfolgreiche Transformation z. B. mit Hilfe eines Selektionsmarkers nachgewiesen werden kann.

Dieses Transformationsverfahren erwies sich für *B. thuringiensis* und den nahe verwandten *B. cereus* als ungeeignet. Aufgrund der hohen Resistenz der *B. thuringiensis*-Zellen gegenüber Lysozym und der nur mangelhaften Regenerierbarkeit der Protoplasten zu intakten zellwandhaltigen Zellen bleiben die erreichbaren Transformationsraten gering und schwierig zu reproduzieren (Alikhanian, S.J./18/ et al, 1981; Martin, P.A./19/ et al, 1981; Fischer, H.-M./20/ et al, 1984).

Mit diesem Verfahren lassen sich daher höchstens sehr einfache Plasmide, die für die Arbeit mit rekombinanter DNA ungeeignet sind, mit geringer Frequenz in *B. thuringiensis*- oder *B. cereus*-Zellen einschleusen.

Einzelne Berichte über zufriedenstellende Transformationsraten, die mit Hilfe des zuvor beschriebenen Verfahrens erreicht werden konnten, beruhen auf der Ausarbeitung sehr aufwendiger Optimierungsprogramme, die aber immer nur konkret für einen bestimmten *B. thuringiensis*-Stamm anwendbar sind und mit einem hohen Aufwand an Zeit und Kosten verbunden sind (Schall, D./21/, 1986). Diese Verfahren sind daher für eine routinemäßige Anwendung im industriellen Maßstab ungeeignet.

Ziel der Erfindung

Mit der Erfindung wird ein neuartiges Verfahren zur direkten, zielgerichteten und reproduzierbaren genetischen Manipulation von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* zur Verfügung gestellt. Bei dem Verfahren kommen einfache, zum Teil bekannte Verfahrensschritte zur Anwendung.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, neue Verfahren zu entwickeln, die *B. thuringiensis* oder den nahe verwandten *B. cereus* einer direkten genetischen Modifizierbarkeit zugänglich machen, und damit beispielsweise eine Klonierung von Protoxingenen im natürlichen Wirtssystem ermöglichen. Dennoch ist es bisher nicht gelungen, die bestehenden Schwierigkeiten und Probleme zufriedenstellend zu lösen.

Zur Zeit stehen weder geeignete Transformationsverfahren zur Verfügung, die eine schnelle effiziente und reproduzierbare Transformation von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* mit ausreichend hoher Transformationsfrequenz ermöglichen, noch sind geeignete Klonierungsvektoren verfügbar, die eine Anwendung der für andere bakterielle Wirtssysteme bereits etablierten rekombinanten DNA-Techniken auch auf *B. thuringiensis* erlauben. Dies trifft in gleicher Weise auch für *B. cereus* zu.

Diese Aufgabe konnte jetzt überraschenderweise im Rahmen der vorliegenden Erfindung durch die Anwendung einfacher, zum Teil bekannter Verfahrensmaßnahmen gelöst werden.

Erfindungsgemäß wird somit ein neuartiges Verfahren, welches basierend auf der rekombinanten DNA-Technologie erstmals eine direkte, zielgerichtete und reproduzierbare genetische Manipulation von *B. thuringiensis* sowie von *B. cereus* ermöglicht, indem man *Bacillus thuringiensis* und/oder *Bacillus cereus* mit Hilfe eines einfachen Transformationsverfahrens mit hoher Effizienz transformiert, unter Verwendung einer rekombinanten DNA, die für die vorgesehene genetische Manipulation von *Bacillus thuringiensis* und/oder *Bacillus cereus* geeignet ist.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Einschleusung, Klonierung und Expression von Genen oder sonstigen nützlichen DNA-Sequenzen, insbesondere aber von Protoxingenen, in *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus*, das sich dadurch kennzeichnet, daß man

- a) besagte Gene oder DNA isoliert;
- b) die isolierten Gene oder DNA gegebenenfalls mit Expressionssequenzen, die in *Bacillus thuringiensis* und/oder *B. cereus* funktionsfähig sind, operabel verknüpft;
- c) die genetischen Konstruktionen aus Abschnitt b) unter Verwendung geeigneter Vektoren in *Bacillus thuringiensis* und/oder *B. cereus*-Zellen transformiert und
- d) gegebenenfalls ein entsprechendes Genprodukt exprimiert und, sofern gewünscht, isoliert.

Ebenfalls umfaßt von der vorliegenden Erfindung ist eine direkte Methode zur Klonierung, Expression und Identifizierung von Genen oder sonstigen nützlichen DNA-Sequenzen, insbesondere aber von Protoxingenen, in *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus*, das sich dadurch kennzeichnet, daß man

- a) die Gesamt-DNA von *Bacillus thuringiensis* mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme verdaut;
 - b) aus den resultierenden Restriktionsfragmenten solche geeigneter Größe isoliert;
 - c) besagte Fragmente in einen geeigneten Vektor einspleißt;
 - d) *Bacillus thuringiensis* und/oder *B. cereus*-Zellen mit besagtem Vektor transformiert und
 - e) aus den Transformanten mit Hilfe geeigneter Screeningverfahren neue DNA-Sequenzen aufspürt und gegebenenfalls isoliert.
- Neben Strukturgenen können selbstverständlich auch beliebige andere nützliche DNA-Sequenzen in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, wie z. B. nichtkodierende DNA-Sequenzen, die eine regulatorische Funktion aufweisen, wie z. B. 'anti-sense-DNA.

Das erfindungsgemäße Verfahren eröffnet damit eine Vielzahl neuer Möglichkeiten, die sowohl unter wissenschaftlichen als auch unter kommerziellen Gesichtspunkten von außerordentlichem Interesse sind.

So ist es beispielsweise nunmehr erstmals möglich, Aufschlüsse über die Regulation der δ -Endotoxin-Synthese, insbesondere im Hinblick auf die Sporulation, auf der genetischen Ebene zu gewinnen.

Auch die Frage, an welcher Stelle des Toxinmoleküls sich der (die) für die Insektentoxizität verantwortliche(n) Abschnitt(en) befindet(n) und inwieweit diese(r) auch mit der Wirtsspezifität in Zusammenhang steht(en), sollte sich jetzt klären lassen.

Die Kenntnisse der molekularen Organisation der verschiedenen Toxinmoleküle sowie der diese Moleküle kodierenden Toxingene aus den verschiedenen *B. thuringiensis*-Spezies ist von außerordentlichem praktischen Interesse für eine gezielte genetische Manipulation dieser Gene, die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens nunmehr erstmals möglich wird.

Das neue erfindungsgemäße Verfahren erlaubt neben einer gezielten Modifikation der δ -Endotoxin-Gene selbst auch die Manipulation der die Expression dieser Gene kontrollierenden regulatorischen DNA-Sequenzen, wodurch sowohl die spezifischen Eigenschaften der δ -Endotoxine wie z. B. ihre Wirtsspezifität, ihr Resorptionsverhalten u. a. gezielt verändert als auch ihre Produktionsraten gesteigert werden können, z. J. durch den Einbau von stärkeren und effizienteren Promotor-Sequenzen.

Durch gezielte Mutation ausgewählter Gene oder Subgene *in vitro* gelangt man somit zu neuen *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Varianten.

Eine weitere Möglichkeit zur Konstruktion neuer *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Varianten besteht im Zusammenspleißen von Genen oder Genabschnitten, die aus verschiedenen *B. thuringiensis*-Quellen stammen, wodurch *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Stämme mit einem erweiterten Anwendungsspektrum entstehen. Auch synthetisch oder halb-synthetisch hergestellte Toxingene können auf diese Weise für die Konstruktion neuer *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Varietäten verwendet werden.

Darüber hinaus ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren aufgrund der starken Erhöhung der Transformationsfrequenz sowie der Vereinfachung des Verfahrens zum erstenmal die Erstellung von Genbanken sowie ein schnelles Screening von modifizierten und neuen Genen in *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus*.

Insbesondere ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren jetzt erstmals eine direkte Expression von Genbanken in *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* sowie die Identifizierung neuer Protoxingene in *B. thuringiensis* mit Hilfe bekannter, vorzugsweise immunologischer oder biologischer Verfahren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren, das basierend auf einer starken Erhöhung der Effizienz der *B. thuringiensis*-/*B. cereus*-Transformation gegenüber vorbekannten Verfahren erstmals eine direkte genetische Modifikation des *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Genoms möglich macht.

Im einzelnen betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Transformation von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* durch Einschleusung rekombinanter DNA, insbesondere von Plasmid- und/oder Vektor-DNA, in *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen mit Hilfe der Elektroporation.

Bevorzugt ist dabei ein Verfahren zur Transformation von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* mit δ -Endotoxin kodierenden DNA-Sequenzen sowie DNA-Sequenzen, die für ein Protein kodieren, das im wesentlichen die insektentoxischen Eigenschaften besagter *B. thuringiensis* Toxine aufweist.

Ein weiterer Gegenstand vorliegender Erfindung betrifft die Expression von DNA-Sequenzen, die ein δ -Endotoxin kodieren oder aber ein Protein, welches zumindest im wesentlichen die insektentoxischen Eigenschaften des *B. thuringiensis*-Toxins aufweist, in transformierten *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus*-Zellen.

Ebenfalls umfaßt von der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung bifunktionaler Vektoren, sogenannte „shuttle“-Vektoren, für *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* sowie die Verwendung besagter „shuttle“-Vektoren zur Transformation von *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen.

Bevorzugt ist die Konstruktion bifunktionaler Vektoren, die außer in *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* in einem oder mehreren anderen, heterologen Wirtssystemen, insbesondere aber in *E. coli*-Zellen replizieren.

Im besonderen betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von „shuttle“-Vektoren für *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus*, die eine DNA-Sequenz enthalten, die ein δ -Endotoxin-Polypeptid kodiert, das natürlicherweise in *B. thuringiensis* vorkommt, oder aber zumindest ein Polypeptid, das diesem im wesentlichen homolog ist, d. h. das zumindest im wesentlichen die insektentoxischen Eigenschaften des *B. thuringiensis*-Toxins aufweist. Ebenso umfaßt von der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung dieser „shuttle“-Vektoren zur Transformation von *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen sowie die Expression der auf besagten „shuttle“-Vektoren vorhandenen DNA-Sequenzen, insbesondere derjenigen DNA-Sequenzen, die für ein δ -Endotoxin aus *B. thuringiensis* kodieren oder aber zumindest für ein Protein, das im wesentlichen die insektentoxischen Eigenschaften der *B. thuringiensis*-Toxine aufweist.

Ebenso umfaßt von der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* als generelle Wirtsorganismen für die Klonierung und Expression homologer sowie insbesondere auch heterologer DNA oder einer Kombination aus homologer und heterologer DNA.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung betrifft zuvor näher charakterisierten Plasmide und „shuttle“-Vektoren selbst, deren Verwendung zur Transformation von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* sowie die mit diesen transformierten *B. thuringiensis*- und *B. cereus*-Zellen selbst.

Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung sind die bifunktionalen („shuttle“-) Vektoren pXI61 (= pk61) und pXI93 (= pk93), die transformiert in *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD 1 cryB bzw. *B. cereus* 569K, bei der als Internationale Hinterlegungsstelle anerkannten „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen“ (Braunschweig, BRD) gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrages unter der Nummer DSM4573 (DSM 4572, transformiert in *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

HD1 cryB) bzw. DSM4571 (pXI93, transformiert in *B. thuringiensis* var. kurstaki HD1 cryB) und DSM4573 (pXI93, transformiert in *B. cereus* 569K) hinterlegt worden sind.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung neue *B. thuringiensis*- und *B. cereus*-Varietäten, die mit einer DNA-Sequenz transformiert sind, welche ein δ -Endotoxin aus *B. thuringiensis* kodiert und exprimiert oder aber zumindest ein Protein, das im wesentlichen die toxischen Eigenschaften der *B. thuringiensis*-Toxine aufweist.

Die transformierten *B. thuringiensis*- und *B. cereus*-Zellen sowie die von diesen produzierten Toxine können zur Herstellung insektizider Mittel verwendet werden, die einen weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellen.

Ebenso umfaßt sind Verfahren sowie Mittel zur Bekämpfung von Insekten unter Verwendung der zuvor näher charakterisierten transformierten *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen sowie zellfreie Kristallkörper- (δ -Endotoxin) Präparate, welche die von besagten transformierten *Bacillus*-Zellen produzierten Protoxine enthalten.

Im folgenden soll eine kurze Beschreibung der Abbildungen gegeben werden.

Abbildung 1: Transformation von *E. coli* HB101 mit pBR322 (o) und **B. thuringiensis* HD1 cryB mit pBC16 (*) (Δ Anzahl der überlebenden *HD1 cryB-Zellen).

Abbildung 2: Einfluß des Alters einer **B. thuringiensis* HD1 cryB-Kultur auf die Transformationsfrequenz.

Abbildung 3: Einfluß des pH-Wertes der PBS-Pufferlösung auf die Transformationsfrequenz.

Abbildung 4: Einfluß der Saccharosekonzentration der PBS-Pufferlösung auf die Transformationsfrequenz.

Abbildung 5: Abhängigkeit zwischen der Anzahl der Transformanten und der Menge an pro Transformation eingesetzter DNA.

Abbildung 6: Vereinfachte Restriktionskarte des „shuttle“-Vektors *pXI61. Der schraffierte Balken kennzeichnet die vom gram-positiven pBC16 stammenden Sequenzen, der Rest stammt vom gram-negativen Plasmid pUC8.

Abbildung 7: Vereinfachte Restriktionskarte von *pXI93. Der schraffierte Balken kennzeichnet das Protoxin-Strukturgen (Pfeil, Kurhd 1) und die 5'- und 3'- nichtkodierenden Sequenzen. Der restliche nichtschraffierte Teil stammt vom „shuttle“-Vektor *pXI61.

Abbildung 8: SDS (Sodiumdodecylsulfat)/Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Extrakten sporulierender Kulturen von **B. thuringiensis* HD1 cryB, *B. cereus* 569K und ihren Derivaten.

[1: *HD1 cryB (pXI93), 2: *HD1 cryB (pXI61), 3: *HD1 cryB, 4: HD1, LBG B-4449, 5: **B. cereus* 569K (pXI93), 6: 569K]

a) Comassie-gefärbt, M: Molekulargewichtsstandard, MG: Molekulargewicht (Dalton), Pfeil: Position des 130000-Dalton-Protoxins.

b) Western blot des gleichen Gels, versetzt mit polyklonalen Antikörpern gegen das K-1-Kristallprotein von *B. thuringiensis* HD1.

Das Auffinden positiver Banden erfolgte mit Hilfe von markierten Anti-Ziegen-Antikörpern. Pfeil: Position des 130000-Dalton-Protoxins. Weitere Banden sind Abbauprodukte des Protoxins.

Abbildung 9: Transformation von *B. subtilis* LBG B-4468 mit pBC16 Plasmid-DNA mit der für *B. thuringiensis* optimierten Elektroporationsmethode.

(o: Transformanten/ μ g Plasmid DNA; *: Lebendkeimzahl/ml)

* Die im Prioritätsdokument für die Benennung der Plasmide gewählte interne Bezeichnung pK wurde für die Auslandsfassung durch die offiziell anerkannte Bezeichnung pXI ersetzt.

Auch die Bezeichnung für die im Rahmen der Ausführungsbeispiele verwendete asporogene *B. thuringiensis* HD1-Mutante wurde von cryB nach cryB geändert.

Ein wesentlicher Aspekt vorliegender Erfindung betrifft ein neuartiges Transformationsverfahren für *B. thuringiensis* und *B. cereus*, das auf der Einschleusung von Plasmid-DNA in *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen unter Anwendung der an sich bekannten Elektroporationstechnologie beruht.

Nachdem bis zum Zeitpunkt der vorliegenden Erfindung alle Versuche gescheitert waren, die bei anderen bakteriellen Wirtssystemen bereits etablierten Transformationsverfahren auch auf *B. thuringiensis* und den nahe verwandten *B. cereus* zu übertragen, konnte jetzt im Rahmen dieser Erfindung durch die Anwendung der Elektroporationstechnologie sowie begleitender Maßnahmen ein überraschender Erfolg erzielt werden.

Dieser Erfolg muß insbesondere auch deshalb als überraschend und unerwartet angesehen werden, als von Seiten einer sowjetischen Gruppe (Shivarova, N./22/ et al., 1983) bereits zu einem früheren Zeitpunkt Elektroporationsversuche an *B. thuringiensis*-Protoplasten durchgeführt wurden, die erreichten Transformationsfrequenzen aber so gering waren, daß dieses Verfahren in der Folge als unbrauchbar für eine *B. thuringiensis*-Transformation angesehen wurde und infolgedessen keine weitere Beachtung mehr fand.

Aufbauend auf Untersuchungen der für eine Elektroporation von *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen kritischen Verfahrensparameter konnte jetzt überraschenderweise ein Transformationsverfahren entwickelt werden, das in idealer Weise an die Bedürfnisse von *B. thuringiensis* und *B. cereus* angepaßt ist und zu Transformationsraten führt, die in einem Bereich zwischen 10^6 und 10^9 Zellen/ μ g Plasmid-DNA liegen, insbesondere aber in einem Bereich zwischen 10^6 und 10^7 Zellen/ μ g Plasmid-DNA.

Annähernd gleich hohe Transformationsraten mit Werten zwischen 10^2 und maximal 10^6 Transformanten/ μ g Plasmid-DNA, konnten bisher nur mit dem bei Schall/21/ (1986) beschriebenen PEG- (Polyethylenglykol-) Transformationsverfahren erzielt werden. Hohe Transformationsraten bleiben jedoch auf diejenigen *B. thuringiensis*-Stämme beschränkt, für die das PEG Verfahren in sehr zeitaufwendigen Optimierungsstudien spezifisch angepaßt wurde, was dieses Verfahren für eine praktische Anwendung als ungeeignet erscheinen läßt.

Darüber hinaus erweisen sich diese Verfahren in der Praxis in vielen Fällen als nicht oder aber nur schlecht reproduzierbar.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem vorliegenden erfindungsgemäßen Verfahren um ein prinzipiell auf alle *B. thuringiensis*- sowie *B. cereus*-Stämme anwendbares Transformationsverfahren, das weniger zeitaufwendig, rationeller und somit effizienter ist als die traditionellen PEG-Transformationsverfahren.

So können in dem erfindungsgemäßen Verfahren beispielsweise ganze, intakte Zellen eingesetzt werden, wodurch die zeitaufwendige und für *B. thuringiensis* sowie *B. cereus* kritische Protoplastierung sowie die anschließende Regeneration auf komplexen Nährmedien entfällt.

Darüber hinaus kann bei Anwendung der PEG-Verfahren die Durchführung der notwendigen Verfahrensmaßnahmen bis zu einer Woche beanspruchen, während mit dem erfindungsgemäßen Transformationsverfahren die transformierten Zellen innerhalb weniger Stunden (in der Regel über Nacht) erhältlich sind.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft die Anzahl von *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen, die pro Zeiteinheit transformiert werden kann.

Während bei den traditionellen PEG-Verfahren nur kleine Aliquots gleichzeitig ausplattiert werden können, um eine Hemmung der Regeneration durch ein zu dichtes Wachstum der Zellen zu vermeiden, können bei Anwendung der Elektroporationstechnik große Mengen an *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen gleichzeitig ausplattiert werden.

Dies ermöglicht den Nachweis von Transformanten auch bei sehr kleinen Transformationsfrequenzen, was mit den vorbeschriebenen Verfahren nicht oder aber nur mit erheblichem Aufwand möglich ist.

Darüber hinaus genügen bereits DNA-Mengen im Nanogramm-Bereich, um zumindest einige Transformanten zu erhalten. Dies ist ganz besonders dann von Bedeutung, wenn ein sehr effizientes Transformationssystem benötigt wird, wie beispielsweise bei der Verwendung von DNA-Material aus *E. coli*, was aufgrund eines stark ausgeprägten Restriktionssystems in *B. thuringiensis*-Zellen gegenüber *B. thuringiensis*-DNA zu einer Reduktion der Transformationsfrequenzen um den Faktor 10^3 führen kann.

Das erfindungsgemäße Transformationsverfahren, daß im wesentlichen auf der an sich bekannten Elektroporationstechnologie basiert, ist durch die folgenden spezifischen Verfahrensmaßnahmen charakterisiert:

- a) Herstellen einer Zellsuspension mit geeigneter Zelldichte in einem für die Anzucht von *B. thuringiensis*-Zellen geeigneten Kultivierungsmedium und bei einer für das Wachstum der Zellen ausreichenden Belüftung;
- b) Abtrennen der Zellen aus der Zellsuspension und resuspendieren in einem für die nachfolgende Elektroporation geeigneten Inokulationspuffer;
- c) Zugabe einer DNA-Probe in einer für die Elektroporation geeigneten Konzentration;
- d) Einbringen des unter Punkt b) und c) beschriebenen Ansatzes in eine Elektroporationsapparatur;
- e) eine oder mehrere kurzzeitige Entladungen eines Kondensators über die Zellsuspension zur kurzfristigen Erzeugung hoher elektrischer Feldstärken über einen Zeitraum, der für eine Transformation von *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen mit rekombinanter DNA ausreichend ist;
- f) gegebenenfalls Nachinkubation der elektroporierten Zellen;
- g) Ausplattieren der elektroporierten Zellen auf einem geeigneten Selektionsmedium und
- h) Auslesen der transformierten Zellen.

In einer spezifischen und im Rahmen dieser Erfindung bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die *B. thuringiensis*-Zellen zunächst in einem geeigneten Nährmedium bei ausreichender Belüftung und bei einer geeigneten Temperatur, vorzugsweise von 30°C bis 35°C, inkubiert, bis eine optische Dichte (OD_{550}) von 0,1 bis 1,0 erreicht ist. Das Alter der für die Elektroporation vorgesehenen *Bacillus*-Kulturen hat einen deutlichen Einfluß auf die Transformationsfrequenz. Besonders bevorzugt ist daher eine optische Dichte der *Bacillus*-Kulturen von 0,1 bis 0,3, insbesondere aber von 0,2. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß sich auch mit *Bacillus*-Kulturen aus anderen Wachstumsphasen, insbesondere auch mit Übernachtskulturen gute Transformationsfrequenzen erzielen lassen (siehe Abbildung 2).

Als Ausgangsmaterial verwendet man in der Regel frische Zellen oder Sporen, es kann aber ebenso gut auch auf tiefgefrorenes Zellmaterial zurückgegriffen werden. Dabei handelt es sich vorzugsweise um Zellsuspensionen von *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen in geeigneten Flüssigmedien, welchen vorteilhafterweise ein bestimmter Anteil eines „Frostschutzmittels“ zugesetzt wird.

Geeignete Frostschutzmittel sind in erster Linie Gemische von osmotisch aktiven Komponenten und DMSO in Wasser oder einer geeigneten Pufferlösung. Weitere geeignete Komponenten, die für eine Verwendung in Frostschutzmittellösungen in Frage kommen, umfassen Zucker, mehrwertige Alkohole, wie z. B. Glycerin, Zuckeralkohole, Aminosäuren und Polymere, wie z. B. Polyethylenglykol.

Geht man von *B. thuringiensis*-Sporen aus, so werden diese zunächst in einem geeigneten Medium inokuliert und über Nacht bei einer geeigneten Temperatur, vorzugsweise von 25°C bis 28°C, und ausreichender Belüftung inkubiert. Dieser Ansatz wird anschließend verdünnt und in der oben beschriebenen Weise weiterbehandelt.

Zur Induktion der Sporulation bei *B. thuringiensis* können alle Medien verwendet werden, die eine solche Sporulation hervorrufen. Bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist ein GYS-Medium nach Yousten, A.A., und Rogoff, M.H./23/, (1969).

Der Sauerstoffeintrag in das Kultivierungsmedium erfolgt in der Regel durch Bewegen der Kulturen, z. B. auf einer Schüttelmaschine, wobei Umdrehungsgeschwindigkeiten zwischen 50 Upm und 300 Upm bevorzugt sind.

Die Kultivierung von *B. thuringiensis*-Sporen sowie vegetativer Mikroorganismenzellen im Rahmen der vorliegenden Erfindung erfolgt nach bekannten, allgemein gebräuchlichen Methoden, wobei aus Gründen der Praktikabilität vorzugsweise flüssige Nährmedien verwendet werden.

Die Zusammensetzung der Nährmedien kann je nach verwendetem *B. thuringiensis*- bzw. *B. cereus*-Stamm leicht variieren.

Allgemein werden komplexe Medien mit wenig definierten, leicht assimilierbaren Kohlenstoff- (C-) und Stickstoff- (N-) Quellen bevorzugt, wie sie üblicherweise für die Kultivierung aerober *Bacillus*-Arten eingesetzt werden.

Zusätzlich werden Vitamine und essentielle Metallionen benötigt, die aber in der Regel in den verwendeten komplexen Nährmedien in ausreichender Konzentration als Bestandteile bzw. Verunreinigungen enthalten sind.

Gegebenenfalls können besagte Bestandteile wie z. B. essentielle Vitamine sowie Na^+ , K^+ , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , NH_4^+ , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Cl^- , CO_3^{2-} -Ionen und die Spurenelemente Cobalt und Mangan, Zink u. a. in Form ihrer Salze zugesetzt werden.

Als besonders geeignete Stickstoffquellen sind neben Hefe-Extrakten, Hefe-Hydrolysaten, Hefe-Autolysaten sowie Hefe-Zellen vor allem Sojamehl, Maismehl, Hafermehl, Edamin (enzymatisch verdautes Lactalbumin), Pepton, Caseinhydrolysat, Maisablaugen sowie Fleischextrakte zu nennen, ohne daß der Erfindungsgegenstand durch diese beispielhafte Aufzählung in irgendeiner Weise eingeschränkt werden soll.

Die bevorzugte Konzentration für die genannten N-Quellen liegt zwischen 1,0g/l und 20g/l.

Als C-Quellen kommen in erster Linie Glucose, Lactose, Sucrose, Dextrose, Maltose, Stärke, Carcelose, Cellulose sowie Malzextrakt in Frage. Der bevorzugte Konzentrationsbereich liegt zwischen 1,0g/l und 20g/l.

Neben komplexen Nährmedien können selbstverständlich auch halb- oder vollsynthetische Medien verwendet werden, die die oben näher bezeichneten Nährstoffe in geeigneter Konzentration enthalten.

Außer dem im Rahmen der vorliegenden Erfindungen bevorzugt verwendeten LB-Medium können auch alle anderen, für die Kultivierung von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* geeigneten Kulturmedien verwendet werden, wie z. B. Antibiotic Medium 3, SCGY-Medium u. a. Die Aufbewahrung sporulierter *B. thuringiensis*-Kulturen erfolgt bevorzugterweise auf GYS-Medien (Schrägagar) bei einer Temperatur von 4°C.

Nachdem die Zellkultur die gewünschte Zelldichte erreicht hat, werden die Zellen mit Hilfe einer Zentrifugation geerntet und in einer geeigneten Pufferlösung suspendiert, die zuvor vorzugsweise mit Eis gekühlt wird.

Die Temperatur erwies sich im Laufe der Untersuchungen als nicht kritisch und ist daher in einem weiten Bereich frei wählbar.

Bevorzugt ist ein Temperaturbereich von 0°C bis 35°C, vorzugsweise von 2°C bis 15°C und ganz besonders bevorzugt von 4°C.

Die Inkubationsdauer der *Bacillus*-Zellen vor und nach der Elektroporation hat nur geringen Einfluß auf die erreichbare Transformationsfrequenz (siehe Tabelle 1). Einzig eine überlange Inkubation führt zu einer Abnahme der

Transformationshäufigkeit. Bevorzugt ist eine Inkubationszeit von 0,1 bis 30 Minuten, insbesondere von 10 Minuten. Die Temperatur erwies sich im Laufe der Untersuchungen als nicht kritisch und ist daher in einem weiten Bereich frei wählbar.

Bevorzugt ist ein Temperaturbereich von 0°C bis 35°C, vorzugsweise von 2°C bis 15°C und ganz besonders bevorzugt von 4°C.

Dieser Vorgang kann einmal bis mehrmals wiederholt werden. Besonders geeignete Pufferlösungen im Rahmen dieser Erfindung sind osmotisch stabilisierte Phosphatpuffer, die als stabilisierendes Agens Zucker, wie z. B. Glucose oder Saccharose, oder Zuckeralkohole, wie z. B. Mannit, enthalten und auf pH-Werte von 5,0 bis 8,0 eingestellt sind. Ganz besonders bevorzugt sind Phosphatpuffer vom PBS-Typ mit einem pH-Wert von 5,0 bis 8,0, vorzugsweise von pH 5,5 bis 6,5, die Saccharose als stabilisierendes Agens in einer Konzentration von 0,1 M bis 1,0 M, vorzugsweise aber von 0,3 M bis 0,5 M, enthalten (siehe Abbildungen 3 und 4).

Aliquots der suspendierten *Bacillus*-Zellen werden anschließend in Küvetten oder beliebige andere, geeignete Gefäße überführt und mit einer DNA-Probe für einen geeigneten Zeitraum, vorzugsweise für einen Zeitraum von 0,1 bis 30 Minuten, insbesondere aber von 5 bis 15 Minuten, und bei einer geeigneten Temperatur, vorzugsweise bei einer Temperatur von 0°C bis 35°C, insbesondere aber bei einer Temperatur von 2°C bis 15°C und ganz besonders bevorzugt bei einer Temperatur von 4°C, gemeinsam inkubiert.

Beim Arbeiten mit tiefen Temperaturen ist es vorteilhaft, bereits vorgekühlte Küvetten oder beliebige andere, geeignete und vorgekühlte Gefäße zu verwenden.

Zwischen der Anzahl transformierter Zellen und der bei der Elektroporation verwendeten DNA-Konzentration besteht über einen weiten Bereich ein linearer Zusammenhang, wobei die Anzahl transformierter Zellen mit steigender DNA-Konzentration zunimmt (siehe Abbildung 5). Die im Rahmen dieser Erfindung bevorzugte DNA-Konzentration liegt in einem Bereich zwischen 1 ng

und 20 µg. Besonders bevorzugt ist eine DNA-Konzentration von 10 ng bis 2 µg.

Danach wird der gesamte Ansatz enthaltend *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen sowie Plasmid-DNA oder eine andere geeignete DNA-Probe in eine Elektroporationsapparatur und einer Elektroporation unterzogen, d. h. kurzzeitig einem elektrischen Impuls ausgesetzt.

Elektroporationsapparaturen, die für eine Verwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet sind, werden mittlerweile bereits von verschiedenen Herstellern angeboten, wie z. B. der Fa. Bio Rad (Richmond, CA, USA; „Gene Pulser Apparatus“), Biotechnologies and Experimental Research, Inc. (San Diego, CA, USA; „BTX Transfactor 100“), Promiga (Madison, WI, USA; „X-Cell 2000 Electroporation System“), usw.

Selbstverständlich kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren auch jedes beliebige andere geeignete Gerät verwendet werden.

Es können dabei verschiedene Impulsformen verwendet werden, so z. B. Rechteckimpulse oder aber exponentiell abklingende Impulse.

Letztere sind im Rahmen dieser Erfindung bevorzugt. Sie kommen durch die Entladung eines Kondensators zustande und sind charakterisiert durch einen zunächst sehr raschen Anstieg der Spannung sowie durch eine sich anschließende exponentielle Abklingphase als Funktion aus Widerstand und Kapazität. Die Zeitkonstante RC gibt ein Maß für die Länge der exponentiellen Abklingzeit. Sie entspricht derjenigen Zeit, die benötigt wird, um die Spannung auf 37% der Ausgangsspannung (V_0) abklingen zu lassen.

Ein für die Beeinflussung der Bakterienzelle entscheidender Parameter betrifft die Stärke des elektrischen Feldes, mit dem die Zellen beaufschlagt werden und das sich aus dem Verhältnis von angelegter Spannung und dem Abstand der Elektrodenplatten berechnet.

Ebenfalls von großer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die exponentielle Abklingzeit, die sowohl von der Konfiguration der verwendeten Apparatur (z. B. der Kapazität des Kondensators) als auch von anderen Parametern abhängt, wie z. B. der Zusammenhang der Pufferlösung oder den eingesetzten Volumina der für die Elektroporation vorgesehenen Zellsuspension. So hat es sich beispielsweise im Verlaufe der Untersuchungen gezeigt, daß eine Reduktion des Volumens der für die Elektroporation vorgesehenen Zellsuspension um die Hälfte zu einer Erhöhung der Transformationsfrequenz um den Faktor 10 führt.

Eine Verlängerung der exponentiellen Abklingzeit über eine Optimierung der verwendeten Pufferlösung resultiert ebenfalls in einer deutlichen Erhöhung der Transformationsfrequenz.

Alle Maßnahmen, die zu einer Verlängerung der exponentiellen Abklingzeit und in der Folge zu einer Erhöhung der Transformationsfrequenz führen, sind daher im Rahmen dieser Erfindung bevorzugt.

Die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugte Abklingzeit liegt zwischen etwa 2 ms und etwa 50 ms, insbesondere aber zwischen etwa 8 ms und etwa 20 ms. Ganz besonders bevorzugt ist eine exponentielle Abklingzeit von etwa 10 ms bis etwa 12 ms.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die Bakterienzellen durch kurzzeitige Entladung(en) eines Kondensators über die DNA-haltige Zellsuspension kurzfristig mit sehr hohen elektrischen Feldstärken beaufschlagt, wodurch die Permeabilität der *B. thuringiensis*-Zellen kurzfristig und reversibel erhöht wird. Die Elektroporationsparameter werden im Verlaufe des erfindungsgemäßen Verfahrens in einer Weise aufeinander abgestimmt, daß eine optimale Aufnahme der im Elektroporationspuffer befindlichen DNA in die *Bacillus*-Zellen gewährleistet ist.

Die Kapazitätseinstellung am Kondensator beträgt im Rahmen dieser Erfindung vorteilhafterweise 1 µF bis 250 µF, insbesondere aber 1 µF bis 50 µF und ganz besonders bevorzugt 25 µF. Die Wahl der Ausgangsspannung ist in weiten Bereichen unkritisch und daher frei wählbar. Bevorzugt ist eine Ausgangsspannung V_0 von 0,2 kV bis 50 kV, insbesondere aber von 0,2 kV bis 2,5 kV und

ganz besonders bevorzugt von 1,2 kV bis 1,8 kV. Der Abstand der Elektrodenplatten hängt u. a. ab von der Dimensionierung der Elektroporationsapparatur. Er beträgt vorteilhafterweise zwischen 0,1 cm und 1,0 cm, vorzugsweise zwischen 0,2 cm und 1,0 cm. Besonders bevorzugt ist ein Plattenabstand von 0,4 cm. Aus dem Abstand der Elektrodenplatten und der am Kondensator eingestellten Ausgangsspannung ergeben sich die Feldstärkewerte, die auf die Zellsuspension einwirken. Diese liegen vorteilhafterweise in einem Bereich zwischen 100 V/cm und 50000 V/cm. Besonders bevorzugt sind Feldstärken von 100 V/cm bis 10000 V/cm, insbesondere aber von 3000 V/cm bis 4500 V/cm.

Die Feinabstimmung der frei wählbaren Parameter, wie z. B. Kapazität, Ausgangsspannung, Plattenabstand usw. hängt bis zu einem gewissen Grad von der Architektur der verwendeten Geräte ab und kann daher von Fall zu Fall in bestimmten Grenzen variieren. Die angegebenen Grenzwerte können daher in gewissen Fällen auch über- oder unterschritten werden, sofern dies zum Erreichen optimaler Feldstärkewerte erforderlich sein sollte.

Der eigentliche Elektroporationsvorgang kann einmal bis mehrmals wiederholt werden, bis eine für das jeweilige System optimale Transformationsfrequenz erreicht ist.

Im Anschluß an die Elektroporation kann vorteilhafterweise eine Nachinkubation der behandelten *Bacillus*-Zellen durchgeführt werden, vorzugsweise für einen Zeitraum von 0,1 bis 30 Minuten, bei einer Temperatur von 0°C bis 35°C, vorzugsweise von 2°C bis 15°C. Anschließend werden die elektroporierten Zellen mit einem geeigneten Medium verdünnt und nochmals für einen geeigneten Zeitraum, vorzugsweise von 2 bis 3 Stunden, unter ausreichender Belüftung und bei einer geeigneten Temperatur, vorzugsweise von 20°C bis 35°C, inkubiert.

Anschließend werden die *B. thuringiensis*-Zellen auf Festmedien ausplattiert, die ein für die Selektion der neu in die Bakterienzelle eingeführten DNA-Sequenzen geeignetes Agens als Zusatz enthalten. Je nach Art der verwendeten DNA kann es sich bei besagten Agenzien z. B. um antibiotisch wirksame Verbindungen, um Farbstoffe u. a. handeln. Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung für die Selektion von *Bacillus thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen sind Antibiotika, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tetracyclin, Kanamycin, Chloramphenicol und Erythromycin.

Ebenfalls bevorzugt sind chromogene Substrate, wie z. B. X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid), die anhand einer spezifischen Farbreaktion nachgewiesen werden können.

Andere phänotypische Marker sind dem Fachmann bekannt und können ebenfalls im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

Es können dabei beliebige, für die Kultivierung von *B. thuringiensis*-Zellen geeignete Nährmedien verwendet werden, denen eines der üblicherweise verwendeten Verfestigungsmedien, wie z. B. Agar, Agarose, Gelatine u. a. zugesetzt wird.

Die zuvor im einzelnen für *B. thuringiensis* beschriebenen Verfahrensparameter sind in gleicher Weise auch auf *B. cereus*-Zellen anwendbar.

Das zuvor beschriebene erfindungsgemäße Verfahren zur Transformation von *B. thuringiensis* bzw. *B. cereus* bleibt nicht, wie die bisher im Stand der Technik zur Verfügung stehenden Verfahren, auf die Verwendung von bestimmten natürlicherweise in *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* vorkommenden Plasmiden beschränkt, sondern ist für alle Arten von DNA anwendbar.

Somit ist es nunmehr erstmals möglich, *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* gezielt zu transformieren, wobei neben homologer, d. h. natürlicherweise in *B. thuringiensis* oder dem nahe verwandten *B. cereus* vorkommender Plasmid-DNA, auch Plasmid-DNA heterologen Ursprungs verwendet werden kann.

Dabei kann es sich sowohl um Plasmid-DNA handeln, die natürlicherweise in einem anderen Organismus als *B. thuringiensis* oder dem nahe verwandten *B. cereus* vorkommt, wie beispielsweise die Plasmide pUB110 und pC194 aus *Staphylococcus aureus* (Horinouchi, S., und Weisblum, B./24/, 1982; Polak, J., und Novick, R. P./25/, 1982) sowie das Plasmid pIMI3 aus *B. subtilis* (Mahler, J. und Halvorson, H. O./26/, 1980), die in der Lage sind, in *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* zu replizieren, als auch um hybride Plasmid-DNA, die mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie aus homologer Plasmid-DNA oder aus heterologer Plasmid-DNA oder aber aus einer Kombination von homologer und heterologer Plasmid-DNA konstruiert wird. Letztgenannte hybride Plasmid-DNA ist besser geeignet für die Arbeiten mit rekombinanter DNA als die natürliche Isolate. Beispielhaft seien hier die Plasmide pBD64 (/27/ Gryczan T et al, 1980), pBD347, pBD348 sowie pUB1664 genannt, ohne dadurch jedoch den Gegenstand vorliegender Anmeldung in irgendeiner Weise zu beschränken.

Von besonderer Bedeutung für die Durchführung von Klonierungsexperimenten bei verschiedenen *B. thuringiensis*- bzw. *B. cereus*-Stämmen dürften die für *B. subtilis* bereits etablierten Klonierungsvektoren, wie beispielsweise pBD64, sein. Neben Plasmid-DNA kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch jede beliebige andere DNA in *B. thuringiensis* bzw. *B. cereus* transformiert werden. Die transformierte DNA kann dabei entweder autonom oder integriert im Chromosom replizieren. Dabei kann es sich beispielsweise um eine Vektor-DNA handeln, die sich nicht von einem Plasmid, sondern von einem Phagen ableitet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Konstruktion von bifunktionellen Vektoren („shuttle“-Vektoren).

Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Konstruktion und Verwendung von bifunktionellen (hybriden) Plasmid-Vektoren, sogenannten „shuttle“-Vektoren, die in der Lage sind, außer in *B. thuringiensis* oder dem nahe verwandten *B. cereus* in einem oder aber in mehreren heterologen Wirtsorganismen zu replizieren und die sowohl in homologen als auch in heterologen Wirtssystemen identifizierbar sind.

Als heterologe Wirtsorganismen sind im Rahmen dieser Erfindung alle diejenigen Organismen zu verstehen, die nicht in die Gruppe *B. thuringiensis*/*B. cereus* gehören und die in der Lage sind, eine sich selbst replizierende DNA stabil zu erhalten.

Als heterologe Wirtsorganismen können gemäß obiger Definition somit sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Organismen fungieren. Beispielhaft seien an dieser Stelle als Vertreter aus der Gruppe der prokaryontischen Wirtsorganismen einzelne Vertreter aus den Gattungen *Bacillus*, wie z. B. *B. subtilis* oder *B. megaterium*, *Staphylococcus*, wie z. B. *S. aureus*, *Streptococcus*, wie z. B. *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces*, wie z. B. *Streptomyces* spp., *Pseudomonas*, wie z. B.

A. tumefaciens oder *A. rhizogenes*, *Salmonella*, *Erwinia*, usw. genannt. Aus der Gruppe der eukaryontischen Wirte sind in erster Linie Hefen sowie tierische und pflanzliche Zellen zu nennen. Diese beispielhafte Aufzählung ist nicht abschließend und soll den Gegenstand der vorliegenden Erfindung in keiner Weise limitieren. Dem Fachmann sind weitere geeignete Vertreter aus der Gruppe der prokaryontischen und eukaryontischen Wirtsorganismen bekannt.

Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung sind *B. subtilis* oder *B. megaterium*, *Pseudomonas* spp. und insbesondere *E. coli* aus der Gruppe der prokaryontischen Wirte sowie Hefen und tierische oder pflanzliche Zellen aus der Gruppe der eukaryontischen Wirte.

Ganz besonders bevorzugt sind bifunktionelle Vektoren, die in der Lage sind, sowohl in *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen: als auch in *E. coli* zu replizieren.

Ebenso umfaßt von der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung besagter bifunktionaler Vektoren zur Transformation von *B. thuringiensis* und *B. cereus*.

Die Konstruktion von „shuttle“-Vektoren erfolgt mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie, wobei Plasmid- und/oder Vektor-DNA homologen (*B. thuringiensis*, *B. cereus*) sowie heterologen Ursprungs zunächst mit Hilfe von geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten werden und anschließend diejenigen DNA-Fragmente, welche die für die Replikation in dem jeweiligen gewünschten Wirtssystem essentiellen Funktionen enthalten, in Gegenwart geeigneter Enzyme wieder miteinander verknüpft werden.

Als Quelle für Plasmid- und/oder Vektor-DNA heterologen Ursprungs können die zuvor genannten heterologen Wirtsorganismen dienen.

Die Verknüpfung der verschiedenen DNA-Fragmente muß in einer Weise erfolgen, daß die für die Replikation in den verschiedenen Wirtssystemen essentiellen Funktionen erhalten bleiben.

Daneben kann selbstverständlich auch Plasmid- und/oder Vektor-DNA rein heterologen Ursprungs für die Konstruktion von „shuttle“-Vektoren verwendet werden, wobei aber zumindest einer der heterologen Fusionspartner DNA-Abschnitte enthalten muß, die eine Replikation im homologen *B. thuringiensis*-/*B. cereus* Wirtssystem ermöglichen.

Als Quelle von Plasmid- und/oder Vektor-DNA heterologen Ursprungs, die dennoch in der Lage ist, im *B. thuringiensis*-/*B. cereus*-Wirtssystem zu replizieren, seien an dieser Stelle beispielhaft einige Vertreter: aus der Gruppe der gram-positiven Bakterien genannt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Gattungen *Staphylococcus*, wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, wie z. B. *Streptococcus faecalis*, *Bacillus*, wie z. B. *Bacillus megaterium* oder *B. subtilis*, *Streptomyces*, wie z. B. *Streptomyces spp.* usw. Neben den hier beispielhaft aufgezählten Vertretern aus der Gruppe der gram-positiven Bakterien gibt es eine ganze Reihe weiterer Organismen, die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können und die dem Fachmann bekannt sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung bifunktionaler Vektoren, die für die Transformation von *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* geeignet sind, das sich dadurch kennzeichnet, daß man Plasmid-DNA homologen sowie heterologen Ursprungs zunächst

- a) mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme in Fragmente zerlegt und
- b) anschließend diejenigen Fragmente, welche die für die Replikation sowie die Selektionierung in dem jeweiligen gewünschten Wirtssystem essentiellen Funktionen enthalten, in Gegenwart geeigneter Enzyme wieder miteinander verknüpft und zwar in einer Weise, daß die für die Replikation und Selektion in den verschiedenen Wirtssystemen essentiellen Funktionen erhalten bleiben.

Auf diese Weise entstehen bifunktionelle Plasmide, die neben den für eine Replikation in *B. thuringiensis* oder *B. cereus* notwendigen Funktionen weitere DNA-Sequenzen enthalten, die die Replikation in zumindest einem weiteren heterologen Wirtssystem sicherstellen.

Um eine schnelle und effiziente Selektionierung der bifunktionalen Vektoren sowohl in homologen als auch im (in) heterologen Wirtssystem(en) zu gewährleisten, ist es vorteilhaft, besagte Vektoren mit spezifischen Selektionsmarkern zu versehen, die sowohl in *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* als auch in dem(n) heterologen Wirtssystem(en) brauchbar sind, d. h. eine schnelle und unkomplizierte Selektionierung ermöglichen. Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Verwendung Antibiotikaresistenzen kodierender DNA-Sequenzen, insbesondere von DNA-Sequenzen, die für Resistenzen gegenüber Antibiotika ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Kanamycin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Erythromycin u. a. kodieren. Ebenfalls bevorzugt sind Gene, die Enzyme mit einem chromogenen Substrat, wie z. B. X-gal (5-Brum-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid), kodieren. Die transformierten Kolonien können dann sehr einfach anhand einer spezifischen Farbreaktion nachgewiesen werden.

Andere phänotypische Markergene sind dem Fachmann bekannt und können ebenfalls im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Konstruktion von „shuttle“-Vektoren, die neben DNA-Sequenzen, die eine Replikation in *B. thuringiensis* oder *B. cereus* oder in beiden Wirtssystemen erlauben, auch solche DNA-Abschnitte enthalten, die für eine Replikation in weiteren bakteriellen Wirtssystemen, wie beispielsweise in *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Pseudomonas spp.*, *E. coli* usw. notwendig sind.

Ebenfalls bevorzugt sind „shuttle“-Vektoren, die einerseits sowohl in *B. thuringiensis* oder *B. cereus* oder in beiden replizieren, als auch andererseits in eukaryontischen Wirtssystemen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Hefe, tierischen und pflanzlichen Zellen u. a.

Ganz besonders bevorzugt ist die Konstruktion von „shuttle“-Vektoren die neben DNA-Sequenzen, die für die Replikation besagter Vektoren in *B. thuringiensis* oder *B. cereus* oder in beiden Systemen notwendig sind, auch solche DNA-Sequenzen enthalten, die eine Replikation besagter „shuttle“-Vektoren in *E. coli* ermöglichen.

Beispiele solcher Ausgangsplasmide für die Konstruktion von „shuttle“-Vektoren für das *B. thuringiensis*-*B. cereus*/*E. coli*-System, die aber in keiner Weise als limitierend angesehen werden dürfen, sind das *B. cereus*-Plasmid pBC116 sowie das vom *E. coli*-Plasmid pBR322 abgeleitete Plasmid pUC8 (Vieira, J., und Messing, J./28/, 1982).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft bifunktionelle („shuttle“-) Vektoren, die neben den für die Replikation und Selektion in homologen und heterologen Wirtssystemen essentiellen Funktionen zusätzlich noch ein oder mehrere Gene in exprimierbarer Form oder sonstige nützliche DNA-Sequenzen enthalten. Ebenfalls umfaßt von dieser Erfindung sind Verfahren zur Herstellung dieser Vektoren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß man besagte Gene oder sonstigen nützlichen DNA-Sequenzen mit Hilfe geeigneter Enzyme in diese bifunktionalen Vektoren einspleißt.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen „shuttle“-Vektoren sowie des zuvor beschriebenen Transformationsverfahrens ist es somit jetzt erstmals möglich, außerhalb von *B. thuringiensis*-Zellen, in einem fremden Wirtssystem klonierte DNA-Sequenzen mit hoher Effizienz in *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen zu transformieren.

Damit können jetzt erstmals Gene oder sonstige nützliche DNA-Sequenzen, insbesondere auch solche mit regulatorischer Funktion, stabil in *B. thuringiensis*- bzw. *B. cereus*-Zellen eingebracht und dort gegebenenfalls exprimiert werden, wodurch *B. thuringiensis*- bzw. *B. cereus*-Zellen mit neuen und wünschenswerten Eigenschaften entstehen.

Als Gene, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung Verwendung finden können, kommen sowohl homologe als auch

heterologe Gen(e) oder DNA sowie synthetische Gen(e) oder DNA gemäß der im Rahmen der vorliegenden Erfindung gemachten Definition in Betracht sowie Kombinationen besagter DNA's.

Die kodierende DNA-Sequenz kann dabei ausschließlich aus genomischer, aus cDNA bzw. synthetischer DNA konstruiert sein. Eine andere Möglichkeit besteht in der Konstruktion einer hybriden DNA-Sequenz, bestehend sowohl aus cDNA als auch aus genomischer DNA und synthetischer DNA oder aber aus einer Kombination dieser DNA's.

In diesem Fall kann die cDNA aus demselben Gen stammen wie die genomische DNA oder aber sowohl die cDNA wie auch die genomische DNA können aus verschiedenen Genen stammen. In diesem Fall können aber sowohl die genomischen DNA und/oder die cDNA, jede für sich, aus dem gleichen oder aus verschiedenen Genen hergestellt sein.

Wenn die DNA-Sequenz Anteile von mehr als einem Gen beinhaltet, können diese Gene entweder von ein und demselben Organismus, von mehreren Organismen, die verschiedenen Stämmen oder aber von Organismen, die mehr als einer Gattung derselben oder einer anderen taxonomischen Einheit angehören, abstammen.

Um die Expression besagter Strukturgene in der bakteriellen Zelle zu gewährleisten, müssen die kodierenden Gensequenzen zunächst in operabler Weise mit in *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen funktionsfähigen Expressions-Sequenzen verknüpft werden.

Die hybriden Genkonstruktionen im Rahmen der vorliegenden Erfindung enthalten somit neben dem (den) Strukturgen(en) Expressions-Signale, die sowohl Promotor- und Terminator-Sequenzen als auch weitere regulatorische Sequenzen der 3'- und 5'-nichttranslatierten Regionen miteinschließen.

Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung sind die natürlichen Expressionssignale aus *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* selbst sowie Mutanten und Varianten davon, die im wesentlichen der natürlichen Sequenz homolog sind. Im Rahmen dieser Erfindung ist eine DNA-Sequenz einer zweiten DNA-Sequenz dann im wesentlichen homolog, wenn wenigstens 70%, vorzugsweise wenigstens 80%, insbesondere aber wenigstens 90%, der aktiven Abschnitte der DNA-Sequenz homolog sind. Gemäß vorliegender Definition des Begriffs „im wesentlichen homolog“ werden zwei unterschiedliche Nukleotide in einer DNA-Sequenz einer kodierenden Region dann als homolog angesehen, wenn der Austausch des einen Nukleotids gegen das andere eine stille Mutation darstellt.

Ganz besonders bevorzugt ist die Verwendung von sporulationsabhängigen Promotoren aus *B. thuringiensis*, die eine Expression in Abhängigkeit der Sporulation gewährleisten.

Besonders bevorzugt für die Transformation von *B. thuringiensis* bzw. *B. cereus* im Rahmen dieser Erfindung ist die Verwendung von DNA-Sequenzen, die für ein δ -Endotoxin kodieren.

Die kodierende Region des erfindungsgemäßen chimären Gens enthält vorzugsweise eine Nukleotidsequenz, die ein Polypeptid kodiert, welches natürlicherweise in *B. thuringiensis* vorkommt, oder aber ein Polypeptid, das diesem im wesentlichen homolog ist, d. h., das zumindest im wesentlichen die Toxizitätseigenschaften eines kristallinen δ -Endotoxin-Proteins von *B. thuringiensis* aufweist. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung hat ein Polypeptid definitionsgemäß dann im wesentlichen die Toxizitätseigenschaften des kristallinen δ -Endotoxin-Proteins von *B. thuringiensis*, wenn es gegen ein ähnliches von Insekten-Larven insektizid wirkt wie das kristalline Protein einer Unterart von *B. thuringiensis*. Einige geeignete Unterarten sind beispielsweise solche, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *kurstaki*, *berliner*, *alesti*, *tolworthi*, *sotto*, *dendrolimus*, *tenebrionis* und *israelensis*. Die für Lepidoptera-Larven bevorzugte Unterart ist *kurstaki* und insbesondere *kurstaki* HDI. Bei der kodierenden Region kann es sich um eine Region handeln, die natürlicherweise in *B. thuringiensis* vorkommt. Alternativ dazu kann die kodierende Region gegebenenfalls aber auch eine Sequenz enthalten, die sich von der Sequenz in *B. thuringiensis* unterscheidet, die ihr aber aufgrund der Degenerierung des genetischen Codes äquivalent ist.

Die kodierende Region des chimären Gens kann auch ein Polypeptid kodieren, das sich von einem natürlich vorkommenden kristallinen δ -Endotoxin-Protein unterscheidet, das aber immer noch im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften des kristallinen Proteins hat. Solch eine kodierende Sequenz wird gewöhnlicherweise eine Variante einer natürlichen kodierenden Region sein. Unter einer „Variante“ einer natürlichen DNA-Sequenz ist im Rahmen dieser Erfindung definitionsgemäß eine modifizierte Form einer natürlichen Sequenz zu verstehen, die aber noch dieselbe Funktion erfüllt. Die Variante kann eine Mutante oder eine synthetische DNA-Sequenz sein und ist im wesentlichen der entsprechenden natürlichen Sequenz homolog. Im Rahmen dieser Erfindung ist eine DNA-Sequenz einer zweiten DNA-Sequenz dann im wesentlichen homolog, wenn wenigstens 70%, vorzugsweise wenigstens 80%, insbesondere aber wenigstens 90% der aktiven Abschnitte der DNA-Sequenz homolog sind. Gemäß vorliegender Definition des Begriffs „im wesentlichen homolog“ werden zwei unterschiedliche Nukleotide in einer DNA-Sequenz einer kodierenden Region dann als homolog angesehen, wenn der Austausch des einen Nukleotids gegen das andere eine stille Mutation darstellt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann somit jedes, eine Aminosäuresequenz kodierende, chimäre Gen verwendet werden, das die insektiziden Eigenschaften eines *B. thuringiensis*- δ -Endotoxins aufweist und welches die offenbarten und beanspruchten Erfordernisse erfüllt. Besonders bevorzugt ist die Verwendung einer Nukleotidsequenz, die im wesentlichen wenigstens dem Teil oder den Teilen der natürlichen Sequenz homolog ist, die für die insektizide Aktivität und/oder die Wirtsspezifität des *B. thuringiensis*-Toxins verantwortlich ist (sind).

Das durch das chimäre Gen exprimierte Polypeptid hat in der Regel auch wenigstens immunologische Eigenschaften mit einem natürlichen kristallinen Protein gemeinsam, weil es wenigstens zum Teil die gleichen antigenen Determinanten besitzt. Dementsprechend ist das Polypeptid, das von besagtem chimären Gen kodiert wird, vorzugsweise strukturell mit dem δ -Endotoxin des von *B. thuringiensis* produzierten kristallinen Proteins verwandt. *B. thuringiensis* produziert ein kristallines Protein mit einer Untereinheit, die einem Protoxin mit einem Molekulargewicht (MG) von etwa 130000 bis 140000 entspricht. Diese Untereinheit kann durch Proteasen oder durch Alkali in insektizide Fragmente mit einem MG von 70000 und möglicherweise sogar weniger gespalten werden.

Für die Konstruktion chimärer Gene, deren kodierender Abschnitt solche Fragmente des Protoxins oder noch kleinere Teile davon umfaßt, kann die Fragmentierung der kodierenden Region solange fortschreiten, wie die Fragmente oder Teile dieser Fragmente noch die erforderliche insektizide Aktivität aufweisen. Das Protoxin, insektizide Fragmente des Protoxins und insektizide Teile dieser Fragmente können mit anderen Molekülen, wie Polypeptiden und Proteinen, verbunden werden. Kodierende Regionen, die für eine Verwendung im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet sind, können von Genen aus *B. thuringiensis*, die das kristalline Toxin kodieren, erhalten werden (Whiteley et al, PCT Anmeldung WO 86/01536 und US Patente 4448885 und 4467036). Eine bevorzugte Nukleotidsequenz, die ein kristallines Protein kodiert, befindet sich zwischen den Nukleotiden 153 und 3623 in Formel I oder ist eine kürzere Sequenz, die ein insektizides Fragment solch eines kristallinen Proteins kodiert (Geiser et al./5/, 1986, und EP 238,441).

Formel I

10 20 30 40 50 60
 GTTAACACCC TGGGTCAAAA ATTGATATTI AGTAAAAATTA GTTGCACITTT GTGCATTTTT

70 80 90 100 110 120
 TCATAAGATG AGTCATATGT TTTAAATTGT AGTAATGAAA AACAGTATTA TATCATAATG

130 140 150 160 170 180
 AATTGGTATC TTAATAAAAAG AGATGGAGGT AACTTATGGA TAACAATCCG AACATCAATG

190 200 210 220 230 240
 AATGCATTCC TTATAATTGT TTAAGTAACC CTGAAGTAGA AGTATTAGGT GGAGAAAAGAA

250 260 270 280 290 300
 TAGAAACTGG TTACACCCCA ATCGATATTT CCTTGTGCGT AACGCAATTT CTTTTGAGTG

310 320 330 340 350 360
 AATTTGTTCC CGGTGCTGGA TTTGTGTTAG GACTAGTTGA TATAATATGG GGAATTTTTG

370 380 390 400 410 420
 GTCCCTCTCA ATGGGACGCA TTTCTTGTAC AAATTGAACA GTTAATTAAC CAAAGAATAG

430 440 450 460 470 480
 AAGAATTCGC TAGGAACCAA GCCATTTCTA GATTAGAAGG ACTAAGCAAT CTTTATCAAA

490 500 510 520 530 540
 TTTACGCAGA ATCTTTTAGA GAGTGGGAAG CAGATCCTAC TAATCCAGCA TTAAGAGAAG

550 560 570 580 590 600
 AGATGCGTAT TCAATTCAAT GACATGAACA GTGCCCTTAC AACCGCTATT CCTCTTTTTG

610 620 630 640 650 660
 CAGTTCAAAA TTATCAAGTT CCTCTTTTAT CAGTATATGT TCAAGCTGCA AATTTACATT

670 680 690 700 710 720
 TATCAGTTTT GAGAGATGTT TCAGTGTTTG GACAAAGGTG GGGATTTGAT GCCGCGACTA

730 740 750 760 770 780
 TCAATAGTCG TTATAATGAT TTAAGTAGGC TTATTGGCAA CTATACAGAT CATGCTGTAC

790 800 810 820 830 840
 GCTGGTACAA TACGGGATTA GAGCGTGTAT GGGGACCGGA TTCTAGAGAT IGGATAAGAT

850 860 870 880 890 900
 ATAATCAATT TAGAAGAGAA TTAACACTAA CTGTATTAGA TATCGTTTCT CTATTTCCGA

910 920 930 940 950 960
 ACTATGATAG TAGAACGTAT CCAATTCGAA CAGTTTCCCA ATTAACAAGA GAAATTTATA

970 980 990 1000 1010 1020
 CAAACCCAGT ATTAGAAAAT TTTGATGGTA GTTTTCGAGG CTCGGCTCAG GGCATAGAAG

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GAAGTATTAG GAGTCCACAT TTGATGGATA TACTTAACAG TATAACCATC TATACGGATG

1090	1100	1110	1120	1130	1140
CTCATAGAGG	AGAATATTAT	TGGTCAGGGC	ATCAAATAAT	GGCTTCTCCT	GTAGGGTTTT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CGGGGCCAGA	ATTCACTTTT	CCGCTATATG	GAACTATGGG	AAATGCAGCT	CCACAACAAC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
GTATTGTTGC	TCAACTAGGT	CAGGGCGTGT	ATAGAACATT	ATCGTCCACT	TTATATAGAA
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GACCTTTTAA	TATAGGGATA	AATAATCAAC	AACTATCTGT	TCTTGACGGG	ACAGAATTTG
1330	1340	1350	1360	1370	1380
CTTATGGAAC	CTCCTCAAAT	TTGCCATCCG	CTGTATACAG	AAAAAGCGGA	ACGSTAGATT
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CGCTGGATGA	AATACCGCCA	CAGAATAACA	ACGTGCCACC	TAGGCAAGGA	TTTAGTCATC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GATTAAGCCA	TGTTTCAATG	TTTCGTTTCA	GCTTTAGTAA	TAGTAGTGTA	AGTATAATAA
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GAGCTCCTAT	GTTCTCTTGG	ATACATCGTA	GTGCTGAATT	TAATAATATA	ATTCCTTCAT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CACAAATTAC	ACAAATACCT	TTAACAAAAT	CTACTAATCT	TGGCTCTGGA	ACTTCTGTGG
1630	1640	1650	1660	1670	1680
TTAAAGGACC	AGGATTTACA	GGAGGAGATA	TTCTTCGAAG	AACTTCACCT	GGCCAGATTT
1690	1700	1710	1720	1730	1740
CAACCTTAAG	AGTAAATATT	ACTGCACCAT	TATCACAAAAG	ATATCGGGTA	AGAATTCGCT
1750	1760	1770	1780	1790	1800
ACGCTTCTAC	CACAAATTTA	CAATTCATA	CATCAATTGA	CGGAAGACCT	ATTAATCAGG
1810	1820	1830	1840	1850	1860
GGAATTTTTC	AGCAACTATG	AGTAGTGGGA	GTAATTTACA	GTCCGGAAGC	TTTAGGACTG
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TAGGTTTTAC	TACTCCGTTT	AACTTTTCAA	ATGGATCAAG	TGIATTTACG	TTAAGTGCTC
1930	1940	1950	1960	1970	1980
ATGTCTTCAA	TTCAGGCAAT	GAAGTTTATA	TAGATCGAAT	TGAATTTGTT	CCGGCAGAAG
1990	2000	2010	2020	2030	2040
TAACCTTTGA	GGCAGAATAT	GATTTAGAAA	GAGCACAAAA	GGCGGTGAAT	GAGCTGTTTA
2050	2060	2070	2080	2090	2100
CTTCTTCCAA	TCAAATCGGG	TTAAAAACAG	ATGTGACGGA	TTATCATATT	GATCAAGTAT
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CCAATTTAGT	TGAGTGTTTA	TCTGATGAAT	TTTGTCTGGA	TGAAAAAAA	GAATTGTCCG

2170 2180 2190 2200 2210 2220
 AGAAAGTCAA ACATGCGAAG CGACTTAGTG ATGAGCGGAA TTTACTTCAA GATCCAAACT
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 TTAGAGGGAT CAATAGACAA CTAGACCGTG GCTGGAGAGG AAGTACGGAT ATTACCA.TCC
 2290 2300 2310 2320 2330 2340
 AAGGAGGCGA TGACGTATTC AAAGAGAATT ACGTTACGCT ATTGGGTACC TTTGATGAGT
 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 GCTATCCAAC GTATTTATAT CAAAAAATAG ATGAGTCGAA ATTA AAAAGCC TATACCCGT
 2410 2420 2430 2440 2450 2460
 ACCAATTAAG AGGGTATATC GAAGATAGTC AAGACTTAGA AATCTATTTA ATTCCGTACA
 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 ATGCCAAACA CGAAACAGTA AATGTGCCAG GTACGGGTC CTTATGGCCG CTTTCAGCCC
 2530 2540 2550 2560 2570 2580
 CAAGTCCAAT CGGAAAATGT GCCCATCATT CCCATCATT CTCCTGGAC ATTGATGTTG
 2590 2600 2610 2620 2630 2640
 GATGTACAGA CTTAAATGAG GACTTAGGTG TATGGGTGAT ATTCAAGATT AAGACGCAAG
 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 ATGGCCATGC AAGACTAGGA AATCTAGAAT TTCTCGAAGA GAAACCATTA GTAGGAGAAG
 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 CACTAGCTCG TGTGAAAAGA GCGGAGAAAA AATGGAGAGA CAAACGTGAA AAATTGGAAT
 2770 2780 2790 2800 2810 2820
 GGGAAACAAA TATTGTTTAT AAAGAGGCAA AAGAATCTGT AGATGCTTTA TTTGTAAACT
 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 CTCAATATGA TAGATTACAA GCGGATACCA ACATCGCGAT GATTCATGGG GCAGATAAAC
 2890 2900 2910 2920 2930 2940
 GCGTTCATAG CATTCCGAGAA GCTTATCTGC CTGAGCTGTC TGTGATTCCG GGTGTCAATG
 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 CGGCTATTTT TGAAGAATTA GAAGGGCGTA TTTTCACTGC ATTCTCCCTA TATGATGCGA
 3010 3020 3030 3040 3050 3060
 GAAATGTCAT TAAAAATGGT GATTTTAATA ATGGCTTATC CTGCTGGAAC GTGAAAGGGC
 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 ATGTAGATGT AGAAGAACAA AACCAACCACC GTTCGGTCCT TGTGTTCGG GAATGGGAAG
 3130 3140 3150 3160 3170 3180
 CAGAAGTGTC ACAAGAAGTT CGTGTCTGTC CGGGTCGTGG CTATATCCTT CGTGTACAG
 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 CGTACAAGGA GGGATATGGA GAAGGTTGCG TAACCATTCA TGAGATCGAG AACAAATACAG
 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 ACCAACTGAA GTTTAGCAAC TGTGTAGAAG AGGAAGTATA TCCAAACAAC ACGGTAACGT

3310 3320 3330 3340 3350 3360
 GTAATGATTA TACTGCGACT CAAGAAGAAT ATGAGGGTAC GTACACTTCT CGTAATCGAG
 3370 3380 3390 3400 3410 3420
 GATATGACGG AGCCTATGAA AGCAATTCTT CTGTACCAGC TGATTATGCA TCAGCCTATG
 3430 3440 3450 3460 3470 3480
 AAGAAAAGC ATATACAGAT GGACGAAGAG ACAATCCTTG TGAATCTAAC AGAGGATATG
 3490 3500 3510 3520 3530 3540
 GGGATTACAC ACCACTACCA GCTGGCTATG TGACAAAAGA ATTAGAGTAC TTCCCAGAAA
 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 CCGATAAGGT ATGGATTGAG ATCGGAGAAA CGGAAGGAC ATTCATCGG GACAGCGTGG
 3610 3620 3630 3640 3650 3660
 AATTACTTCT TATGGAGGAA TAATATATGC TTTATAATGT AAGGTGTGCA AATAAAGAAT
 3670 3680 3690 3700 3710 3720
 GATTACTGAC TTGTATTGAC AGATAAATAA GGAAATTTTT ATATGAATAA AAAACGGGCA
 3730 3740 3750 3760 3770 3780
 TCACTCTTAA AAGAATGATG TCCCTTTTTT GTATGATTTA ACGGTGTGATA TTTAAATGTT
 3790 3800 3810 3820 3830 3840
 TTTTTTGCSA AGGCTTTACT TAACGGGGTA CCGCCACATG CCCATCAACT TAAGAATTTG
 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 CACTACCCCC AAGTGTCAAA AAACGTTATT CTTTCTAAAA AGCTAGCTAG AAAGGATGAC
 3910 3920 3930 3940 3950 3960
 ATTTTTTATG AATCTTTCAA TTCAAGATGA ATTACAATA TTTTCTGAAG AGCTGTATCG
 3970 3980 3990 4000 4010 4020
 TCATTTAAC CCTTCTCTTT TGGAAGAACT CGCTAAAGAA TTAGGTTTTG TAAAAAGAAA
 4030 4040 4050 4060 4070 4080
 ACGAAAGTTT TCAGGAAATG AATTAGCTAC CATATGTATC TGGGGCAGTC AACGTACAGC
 4090 4100 4110 4120 4130 4140
 GAGTGATTCT CTCGTTTCGAC TATGCAGTCA ATTACACGCC GCCACAGCAC TCTTATGAGT
 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 CCAGAAGGAC TCAATLAACG CTTTGATAAA AAAGCGGTTG AATTTTTGAA ATATATTTTT
 4210 4220 4230 4240 4250 4260
 TCTGCATTAT GGAAAAGTAA ACTTTGTAAG ACATCAGCCA TTTCAAGTGC AGCACACACG
 4270 4280 4290 4300 4310 4320
 TATTTTCAAC GAATCCGTAT TTTAGATGCG ACGATTTTCC AAGTACCGAA ACATTTAGCA
 4330 4340 4350 4360
 CATGTATATC CTGGGTCAGG TGGTTGTGCA CAAACTGCAG

Die durch die Nukleotide 156 b's 3623 von Formel I definierte kodierende Region kodiert ein Polypeptid der Formel II.

Formel II

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys	10
Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser Asn Pro Glu	20
Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu	30
Thr Gly Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu	40
Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser Glu Phe	50
Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu	60
Val Asp Ile Ile Trp Gly Ile Phe Gly Pro	70
Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile	80
Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu	90
Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile Ser Arg Leu	100
Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr	110
Ala Glu Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp	120
Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu Met	130
Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala	140
Leu Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val	150
Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val	160
Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser	170
Val Leu Arg Asp Val Ser Val Phe Gly Gln	180
Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn	190
Ser Arg Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile	200
Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val Arg Trp	210
Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly	220
Pro Asp Ser Arg Asp Trp Ile Arg Tyr Asn	230
Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val	240
Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr	250
Asp Ser Arg Thr Tyr Pro Ile Arg Thr Val	260
Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn	270
Pro Val Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe	280
Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu Gly Ser	290
Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu	300

Asn Ser Ile Thr Ile Tyr Thr Asp Ala His	310
Arg Gly Glu Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln	320
Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly	330
Pro Glu Phe Thr Phe Pro Leu Tyr Gly Thr	340
Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile	350
Val Ala Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg	360
Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg Arg Pro	370
Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu	380
Ser Val Leu Asp Gly Thr Glu Phe Ala Tyr	390
Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val	400
Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu	410
Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asn Asn Asn Val	420
Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu	430
Ser His Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe	440
Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile Arg Ala	450
Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala	460
Glu Phe Asn Asn Ile Ile Pro Ser Ser Gln	470
Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr	480
Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys	490
Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu	500
Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr	510
Leu Arg Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser	520
Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr Ala	530
Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser	540
Ile Asp Gly Arg Pro Ile Asn Gln Gly Asn	550
Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn	560
Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly	570
Phe Thr Thr Pro Phe Asn Phe Ser Asn Gly	580
Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val	590
Phe Asn Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp	600
Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu Val Thr	610
Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala	620
Gln Lys Ala Val Asn Glu Leu Phe Thr Ser	630
Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val	640
Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn	650
Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys	660
Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys	670

Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu	680
Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg	690
Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp	700
Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly	710
Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val	720
Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr	730
Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu	740
Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln	750
Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp	760
Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala	770
Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr	780
Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser	790
Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His	800
His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys	810
Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp	820
Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly	830
His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu	840
Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu	850
Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp	860
Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu	870
Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu	880
Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln	890
Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile	900
Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val	910
His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu	920
Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala	930
Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe	940
Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn	950
Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly	960
Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val	970
Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser	980
Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu	990
Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly	1000
Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr	1010
Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr	1020
Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu	1030
Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu	1040

Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn	1050
Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu	1060
Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr	1070
Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val	1080
Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu	1090
Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn	1100
Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp	1110
Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr	1120
Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp	1130
Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu	1140
Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu	1150
Leu Leu Met Glu Glu End	1156

Um ein chimäres Gen mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens in *B. thuringiensis*- bzw. *B. cereus*-Zellen zu transformieren, wird das Ge. . vorzugsweise zuerst in einen Vektor eingebaut. Besonders bevorzugt ist der Einbau in die erfindungsgemäßen bifunktionellen Vektoren.

Wenn das entsprechende Gen nicht in einer Menge zur Verfügung steht, die für die Einschleusung in die *Bacillus*-Zellen ausreicht, kann der Vektor zunächst durch Replikation in einer heterologen Wirtszelle amplifiziert werden. Am besten geeignet für die Amplifikation von Genen sind Bakterien- oder Hefezellen. Wenn eine ausreichende Menge des Gens zur Verfügung steht, wird es in die *Bacillus*-Zellen eingeschleust. Die Einführung des Gens in *B. thuringiensis*- oder *B. cereus*-Zellen kann mit dem gleichen Vektor erfolgen. Besonders geeignet sind die erfindungsgemäßen bifunktionellen Vektoren.

Einige Beispiele für bakterielle Wirtszellen, die für eine Replikation des chimären Gens geeignet sind, umfassen Bakterien, ausgewählt aus den Gattungen *Escherichia*, wie *E. coli*, *Agrobacterium*, wie *A. rhizogenes*, *Pseudomonas*, wie *Pseudomonas* spp., *Bacillus*, wie *B. magneterium* oder *B. subtilis*, usw. Durch das erfindungsgemäße Transformationsverfahren wird es jetzt im Rahmen dieser Erfindung erstmals möglich, auch *B. thuringiensis* bzw. *B. cereus* selbst als Wirtszellen einzusetzen. Verfahren der Klonierung heterologer Gene in Bakterien sind in den US Patenten 4,237,224 und 4,468,464 beschrieben.

Die Replikation von Genen in *E. coli*, die das kristalline Protein von *B. thuringiensis* kodieren, wird von Wong et al./29/ (1983) beschrieben.

Einige Beispiele für Hefewirtszellen, die sich zur Replikation der erfindungsgemäßen Gene eignen, schließen solche, ausgewählt aus der Gattung *Saccharomyces*, ein (Europäische Patentanmeldung EP 0238441).

Für die Amplifikation der erfindungsgemäßen Gene kann jeder beliebige Vektor verwendet werden, in den das chimäre Gen eingebaut werden kann und der sich in einer geeigneten Wirtszelle, wie in Bakterien oder Hefe, repliziert. Der Vektor kann beispielsweise von einem Phagen oder einem Plasmid abgeleitet sein. Beispiele für Vektoren, die von Phagen abgeleitet und im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden können, sind Vektoren die von M13- und von λ -Phagen abgeleitet sind. Einige geeignete Vektoren, die von M13-Phagen abgeleitet sind, schließen M13mp18 und M13mp19 ein. Einige von λ -Phagen abgeleitete geeignete Vektoren schließen λ gt11, λ gt7 und λ -Charon4 ein.

Von den Vektoren, die von Plasmiden abgeleitet und ganz besonders für die Replikation in Bakterien geeignet sind, seien hier beispielhaft pBR322 (Bolivar et al./30/, 1977), pUC18 und pUC19 (Norrander et al./31/, 1983) sowie Ti-Plasmide (Bevan et al./32/, 1983) genannt, ohne dadurch jedoch den Erfindungsgegenstand in irgendeiner Weise zu limitieren. Die bevorzugten Vektoren zur Amplifikation von Genen in Bakterien sind pBR322, pUC18 und pUC19.

Für eine Klonierung direkt in *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* sind in erster Linie Direktklonierungsvektoren zu nennen, wie z. B. pBD347, pBD348, pBD64 sowie pUB1664, sowie insbesondere „shuttle“-Vektoren, die zuvor bereits im Detail beschrieben wurden, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein.

Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung sind die bifunktionellen („shuttle“) Vektoren pXI61 (= pK61) und pXI93 (= pK93), die, transformiert in *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 cryB bzw. *B. cereus* 569K, bei der als Internationale Hinterlegungsstelle anerkannten „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen“ (Braunschweig, BRD) gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrages unter der Nummer DSM4573 (DSM4572, transformiert in *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 cryB) bzw. DSM4571 (pXI93, transformiert in *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 cryB) und DSM4573 (pXI93, transformiert in *B. cereus* 569K) hinterlegt worden sind.

Um ein für die Replikation in Bakterien geeignetes chimäres Gen zu konstruieren, werden eine Promotorsequenz, eine 5'-nichttranslatierte Sequenz, eine kodierende Sequenz und eine 3'-nichttranslatierte Sequenz in einen Vektor eingefügt oder in der richtigen Reihenfolge in einem der zuvor beschriebenen Vektoren zusammengebaut. Geeignete Vektoren sind erfindungsgemäß solche, die in der Lage sind, sich in der Wirtszelle zu replizieren.

Der Promotor, die 5'-nichttranslatierte Region, die kodierende Region und die 3'-nichttranslatierte Region, können gegebenenfalls zuerst außerhalb des Vektors in einer Einheit zusammengefaßt und dann in den Vektor eingefügt werden. Alternativ dazu können aber auch Teile des chimären Gens einzeln in den Vektor eingefügt werden.

Im Falle der *B. thuringiensis*- bzw. *B. cereus*-Klonierungsvektoren kann dieser Verfahrensschritt entfallen, da die gesamte aus *B. thuringiensis* isolierte Einheit, bestehend aus einer 5'-nichttranslatierten Region, der kodierenden Region und einer 3'-nichttranslatierten Region, in den Vektor eingespleißt werden kann.

Der Vektor enthält darüberhinaus vorzugsweise auch ein Markergen, welches der Wirtszelle eine Eigenschaft verleiht, durch die man die mit dem Vektor transformierten Zellen erkennen kann. Bevorzugt sind Markergene, die eine Antibiotikaresistenz kodieren. Einige Beispiele für geeignete Antibiotika sind Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Tetrazyklin, Hygromycin, G 418 und Kanamycin.

Ebenfalls bevorzugt sind Markergene, die Enzyme mit einem chromogenen Substrat, wie z. B. X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid), kodieren. Die transformierten Kolonien können dann sehr einfach anhand einer spezifischen Farbreaktion nachgewiesen werden.

Die Einfügung oder der Zusammenbau des Gens im Vektor wird mit Hilfe von Standardverfahren durchgeführt, beispielsweise die Verwendung von rekombinanter DNA (Maniatis et al./33/, 1982) und die Anwendung der homologen Rekombination (Hinnen et al./34/, 1978).

Die Verfahren der rekombinanten DNA-Technologie beruhen darauf, daß der Vektor zunächst geschnitten und die gewünschte DNA-Sequenz zwischen die geschnittenen Stücke des Vektors eingefügt wird; die Enden der gewünschten DNA-Sequenz werden anschließend mit den entsprechenden Enden des Vektors verknüpft.

Der Vektor wird vorzugsweise mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten. Einige Restriktionsendonukleasen sind beispielsweise solche, die glatte Enden bilden, wie *Sma*I, *Hpa*I und *Eco*RV, sowie solche, die kohäsive Enden bilden, wie *Eco*RI, *Sac*I und *Bam*HI.

Die gewünschte DNA-Sequenz existiert normalerweise als Teil eines größeren DNA-Moleküls, wie eines Chromosoms, eines Plasmids, eines Transposons oder eines Phagen. Die gewünschte DNA-Sequenz wird in diesen Fällen aus ihrer ursprünglichen Quelle herausgeschnitten und gegebenenfalls so modifiziert, daß ihre Enden mit denen des geschnittenen Vektors verbunden werden können. Wenn die Enden der gewünschten DNA-Sequenz und des geschnittenen Vektors glatte Enden sind, können sie beispielsweise mit für glatte Enden spezifischen Ligasen, wie der T4 DNA-Ligase, miteinander verbunden werden.

Die Enden der gewünschten DNA-Sequenz können auch in der Form von kohäsiven Enden mit den Enden des geschnittenen Vektors verbunden werden, in welchem Fall eine für kohäsive Enden spezifische Ligase, die auch T4 DNA-Ligase sein kann, benutzt wird. Eine andere geeignete, für kohäsive Enden spezifische Ligase ist beispielsweise die *E. coli*-DNA-Ligase.

Kohäsive Enden werden zweckmäßigerweise gebildet, indem die gewünschte DNA-Sequenz und der Vektor mit der gleichen Restriktionsendonuklease geschnitten werden. In diesem Fall haben die gewünschte DNA-Sequenz und der geschnittene Vektor kohäsive Enden, die einander komplementär sind.

Die kohäsiven Enden können auch konstruiert werden, indem mit Hilfe der terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase komplementäre, homopolymere Schwänze an die Enden der gewünschten DNA-Sequenz und des geschnittenen Vektors angehängt werden. Alternativ können auch kohäsive Enden hergestellt werden, indem eine synthetische Oligonukleotid-Sequenz, die von einer bestimmten Restriktionsendonuklease erkannt wird und die unter der Bezeichnung Linker bekannt ist, angehängt und die Sequenz mit der Endonuklease gespalten wird (siehe beispielsweise Maniatis et al./33/, 1982).

Damit ist es nunmehr im Rahmen dieser Erfindung erstmals möglich *B. thuringiensis*-Gene, insbesondere aber δ -Endotoxin-kodierende DNA-Sequenzen, außerhalb von *B. thuringiensis* genetisch zu modifizieren, zu klonieren und anschließend in *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen zurückzuführen, wo besagte δ -Endotoxingene (in einem homologen bakteriellen Wirtssystem) exprimiert werden können.

Dies bedeutet, daß nunmehr auch das Genom von *B. thuringiensis* gezielt genetisch manipuliert werden kann, indem zunächst große Mengen an Plasmid-Material in einem fremden Klonierungssystem gewonnen werden und dieses anschließend in *B. thuringiensis* transformiert wird.

Von besonderem Interesse ist dabei die Möglichkeit zur Modifikation der δ -Endotoxingene sowie der die Expression dieser Gene regulierenden Kontrollsequenzen.

Neben chimären Genen kann selbstverständlich auch jede beliebige andere chimäre genetische Konstruktion mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens in *Bacillus thuringiensis*- und/oder *Bacillus cereus*-Zellen eingeschleust werden.

So ist es beispielsweise denkbar unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens nichtkodierende, „antisense“-DNA in das Genom einer *Bacillus thuringiensis*- und/oder *Bacillus cereus*-Zelle einzuschleusen, so daß im Zuge der Expression besagter „antisense“-DNA eine mRNA transkribiert wird, welche die Expression der korrespondierenden „sense“-DNA hemmt. Auf diese Weise ist es möglich, die Expression bestimmter, unerwünschter Gene in *Bacillus thuringiensis* und/oder *Bacillus cereus* gezielt zu unterdrücken.

Darüber hinaus ist nunmehr auch die Möglichkeit gegeben, neben der Bereitstellung verbesserter, gut definierter *B. thuringiensis*-Stämme zur Herstellung von verbesserten Bioinsektiziden, *B. thuringiensis* als generellen Wirt für die Klonierung und gegebenenfalls Expression heterologer und/oder homologer Gene zu verwenden.

In einer spezifischen und bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es darüber hinaus nunmehr erstmals möglich, neue Gene, insbesondere aber neue Protoxingene direkt im natürlichen Wirt, d. h. in *B. thuringiensis* oder *B. cereus* zu klonieren.

Bei der Suche nach neuen Protoxingenen wird zunächst eine Genbibliothek von *B. thuringiensis* erstellt.

In einem ersten Verfahrensschritt wird dabei die Gesamt-DNA eines Protoxin-produzierenden *B. thuringiensis*- Stammes mit Hilfe an sich bekannter Verfahrensmaßnahmen isoliert und anschließend in einzelne Fragmente zerlegt. Die *B. thuringiensis*-DNA kann dabei entweder mechanisch, beispielsweise unter Einwirkung von Scherkräften, oder aber vorzugsweise durch Verdauung mit geeigneten Restriktionsenzymen fragmentiert werden. Je nach Wahl der Enzyme erhält man eine partielle oder eine vollständige Verdauung der DNA-Probe. Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Verwendung von Restriktionsenzymen, die quartäre Erkennungsstellen enthalten und/oder zu einer partiellen Verdauung der *B. thuringiensis*-DNA führen, wie z. B. das Restriktionsenzym *Sau*IIIa, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein. Selbstverständlich können auch alle anderen geeigneten Restriktionsenzyme in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden.

Die auf die zuvor beschriebene Weise gewonnenen Restriktionsfragmente werden dann mit Hilfe an sich bekannter Verfahren entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Für die größenabhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet man in der Regel Zentrifugationsverfahren, wie z. B. die Saccharosegradientenzentrifugation oder elektrophoretische Verfahren, wie die Agarose Gelelektrophorese oder aber eine Kombination dieser Verfahren.

Diejenigen Fraktionen, welche Fragmente der richtigen Größe enthalten, d. h. Fragmente, die aufgrund ihrer Größe in der Lage sind, ein Protoxin zu kodieren, werden vereinigt (gepoolt) und für die weiteren Verfahrensschritte verwendet.

Zunächst werden die zuvor isolierten Fragmente durch Verwendung von Standardverfahren in geeignete Klonierungsvektoren

eingespleißt und anschließend mit Hilfe des erfindungsgemäßen Transformationsverfahrens direkt in *Bacillus thuringiensis* oder *B. cereus*, vorzugsweise aber in pro.oxinfreie Stämme von *Bacillus thuringiensis* eingeschleust.

Als Vektoren können sowohl gram-positive Plasmide, wie z. B. pBC 16, pUB 110, pC 194, als auch die zuvor im einzelnen beschriebenen „Shuttle“-Vektoren verwendet werden. Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist der Shuttle-Vektor pXI 200, der im folgenden im Detail beschrieben ist (siehe Beispiel 9. 1.). Geeignete Vektoren enthalten vorzugsweise DNA-Sequenzen, die eine leichte Identifizierbarkeit der transformierten, vektorhaltigen Klone aus der Unzahl nichttransformierter Klone gewährleistet. Besonders bevorzugt sind DNA-Sequenzen, die einen spezifischen Marker kodieren, der bei Expression zu einem leicht selektionierbaren Merkmal führt, wie z. B. einer Antibiotika-Resistenz. Beispielhaft sei hier eine Resistenz gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Tetracyclin, Hygromycin, G 418 oder Kanamycin genannt. Ebenfalls bevorzugt sind Markergene, die Enzyme mit einem chromogenen Substrat, wie z. B. X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid), kodieren. Die transformierten Kolonien können dann sehr einfach anhand einer spezifischen Farbreaktion nachgewiesen werden.

Nach der Elektroporation werden die behandelten *Bacillus thuringiensis*- oder *B. cereus*-Zellen auf eine selektives Sporulationsmedium übertragen und dort bis zu vollständigen Sporulation bei einer Temperatur von 10°C bis 40°C, vorzugsweise aber bei einer Temperatur von 20°C bis 35°C und ganz besonders bevorzugt bei einer Temperatur von 29°C bis 31°C inkubiert. Das Sporulationsmedium enthält als Selektivsubstanz vorzugsweise eine der obengenannten Antibiotika, abhängig vom verwendeten Vektor, sowie ein geeignetes Verfestigungsmittel, wie z. B. Agar, Agarose, Gelatine, usw. Im Zuge der Sporulation kommt es zur Autolyse der sporulierenden Zellen, was für das nachfolgende Screening von großem verfahrenstechnischem Vorteil ist, da ein künstliches Aufbrechen der Zellen entfällt. Bei Klonen, die das gesuchte Protoxin enthalten und unter der Kontrolle ihres natürlichen Promotors exprimieren, liegen die gebildeten Kristallproteine frei zugänglich im Medium vor. Diese frei im Medium vorliegenden Kristallproteine können dann z. B. mit Hilfe von Membranfiltern oder durch andere geeignete Maßnahmen fixiert werden. Geeignete Membranfilter sind beispielsweise Nylon- oder Nitrozellulose-Membranen. Membranen dieser Art sind frei käuflich.

Die so fixierten Kristallproteine können dann sehr einfach im Rahmen eines geeigneten Screenings aufgespürt und identifiziert werden.

Bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist ein immunologisches Screening unter Verwendung protoxinspezifischer Antikörper. Die Verfahren des Immunscreenings sind bekannt und beispielsweise bei /35/Young et al., 1983 im einzelnen beschrieben. Besonders bevorzugt im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Verwendung monoklonaler Antikörper, die ganz spezifisch einen bestimmten Teil des Proteinmoleküls erkennen. Diese Antikörper können entweder einzeln oder aber in Form eines Gemisches verwendet werden. Darüber hinaus können selbstverständlich auch polyklonale Antiseren für das Immunscreening verwendet werden. Auch Gemische basierend auf monoklonalen und polyklonalen Antikörpern sind denkbar.

Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen *Bacillus thuringiensis*-Protoxin-Proteine sind bekannt und z. B. bei /36/Huber-Lukač, (1984) bzw. bei /37/Huber-Lukač et al., (1986) im Detail beschrieben. Diese Verfahren lassen sich auch im vorliegenden Fall anwenden.

Das immunologische Screening-Verfahren auf der Basis von Antikörpern ist ein Bestandteil der vorliegenden Erfindung. Darüber hinaus können im Rahmen dieser Erfindung selbstverständlich auch andere geeignete Screeningverfahren zum Aufspüren neuer DNA-Sequenzen in *B. thuringiensis* und/oder *B. cereus* verwendet werden.

Bacillus thuringiensis und *B. cereus*-Zellen, die mit Hilfe des zuvor beschriebenen Verfahrens transformiert worden sind, sowie die von diesen transformierten *Bacillus*-Zellen produzierten Toxine eignen sich in hervorragender Weise für die Bekämpfung von Insekten, insbesondere aber zur Bekämpfung von Insekten aus den Ordnungen *Lepidoptera*, *Diptera* und *Coleoptera*.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Bekämpfung von Insekten, das sich dadurch kennzeichnet, daß man Insekten oder deren Lebensraum mit

- a) *B. thuringiensis*- oder *B. cereus*-Zellen oder mit einem Gemisch von beiden behandelt, die mit einem rekombinanten DNA-Molekül transformiert sind, das ein Strukturgen enthält, welches für ein δ -Endotoxin-Polypeptid kodiert, das natürlicherweise in *B. thuringiensis* vorkommt oder aber ein Polypeptid, das diesem im wesentlichen homolog ist; oder aber
- b) mit zellfreien Kristallkörperpräparaten, die ein Protoxin enthalten, das von besagten transformierten *Bacillus*-Zellen produziert wird.

Ebenso umfaßt von der vorliegenden Erfindung sind insektizide Mittel, die neben den üblicherweise verwendeten Trägermitteln, Verteilungsmitteln oder Träger- und Verteilungsmitteln

- a) *B. thuringiensis*- oder *B. cereus*- Zellen oder ein Gemisch besagter *Bacillus*-Zellen enthalten, die mit einem rekombinanten DNA-Molekül transformiert sind, das ein Strukturgen enthält, welches für ein δ -Endotoxin-Polypeptid kodiert, das natürlicherweise in *B. thuringiensis* vorkommt oder aber ein Polypeptid, das diesem im wesentlichen homolog ist; oder aber
- b) zellfreie Kristallkörperpräparate, die ein Protoxin enthalten, das von besagten transformierten *Bacillus*-Zellen produziert wird.

Für die Anwendung als Insektizide werden die transformierten Mikroorganismen, die das rekombinante *B. thuringiensis*-Toxin-Gen enthalten, vorzugsweise transformierte lebende oder tote *B. thuringiensis*- oder *B. cereus*-Zellen, einschließlich Gemischen aus lebenden und toten *B. thuringiensis*- und *B. cereus*-Zellen, sowie die von besagten transformierten Zellen produzierten Toxin-Proteine in unveränderter Form oder vorzugsweise zusammen mit den in der Formulierungstechnik üblichen Hilfsstoffen, eingesetzt und in an sich bekannter Weise formuliert, z. B. zu Suspensionskonzentraten, streichbaren Pasten, direkt versprühbaren oder verdünnbaren Lösungen, benetzbaren Pulvern, löslichen Pulvern, Stäubemitteln, Granulaten, und auch Verkapselungen in z. B. polymeren Stoffen.

Die Anwendungsverfahren wie Versprühen, Vernebeln, Verstäuben, Verstreuen, Bestreichen oder Gießen werden gleich wie die Art der Mittel den angestrebten Zielen und den gegebenen Verhältnissen entsprechend gewählt.

Es können darüber hinaus selbstverständlich auch insektizide Gemische verwendet werden, bestehend aus transformierten, lebenden oder toten *B. thuringiensis*- und/oder *B. cereus*-Zellen sowie aus zellfreien Kristallkörperpräparaten, die ein Protoxin enthalten, das von besagten transformierten *Bacillus*- Zellen produziert wird.

Die Formulierungen, d. h. die die transformierten lebenden oder toten *Bacillus*-Zellen oder Mischungen davon sowie die von besagten transformierten *Bacillus*-Zellen produzierten Toxin-Proteine und gegebenenfalls feste oder flüssige Hilfsmittel

enthaltenden Mittel oder Zubereitungen werden in bekannter Weise hergestellt, z. B. durch inniges Vermischen der transformierten Zellen und/oder Toxin-Proteine mit festen Trägerstoffen und gegebenenfalls oberflächenaktiven Verbindungen (Tensiden).

Als feste Trägerstoffe, z. B. für Stäubemittel und dispergierbare Pulver, werden in der Regel natürliche Gesteinsmehle verwendet, wie Calcit, Talkum, Kaolin, Montmorillonit oder Attapulgit. Zur Verbesserung der physikalischen Eigenschaften können auch hochdisperse Kieselsäure oder hochdisperse saugfähige Polymerisate zugesetzt werden. Als gekörnte adsorptive Granulatträger kommen poröse Typen wie z. B. Bimsstein, Ziegelbruch, Sepiolit oder Bentonit, als nichtsorptive Trägermaterialien z. B. Calcit oder Sand in Frage. Darüber hinaus kann eine Vielzahl von vorgranulierten Materialien anorganischer oder organischer Natur, wie insbesondere Dolomit oder zerkleinerte Pflanzenrückstände verwendet werden.

Als oberflächenaktive Verbindungen kommen nichtionogene, kation- und/oder anionische Tenside mit guten Dispergier- und Netzeigenschaften in Betracht. Unter Tensiden sind auch Tensidgemische zu verstehen.

Geeignete anionische Tenside können sowohl sog. wasserlösliche Seifen als auch wasserlösliche synthetische oberflächenaktive Verbindungen sein.

Als Seifen seien die Alkali-, Erdalkali- oder unsubstituierte oder substituierte Ammoniumsalze von höheren Fettsäuren (C₁₀-C₂₂), wie z. B. die Na- oder K-Salze der Öl- oder Stearinsäure oder von natürlichen Fettsäuregemischen, die z. B. aus Kokosnuß- oder Talgöl gewonnen werden können, genannt. Ferner sind auch die Fettsäure-methyl-aurinsalze zu erwähnen, wie z. B. das Natriumsalz der cis-2-(methyl-9-octadecenylamino)-ethansulfonsäure (Gehalt in Formulierungen vorzugsweise etwa 3%). Häufiger werden jedoch sogenannte synthetische Tenside verwendet, insbesondere Fettsulfonate, Fettsulfate, sulfonierte Benzimidazol-derivate oder Alkylarylsulfonate oder Fett-Alkohole, wie z. B. 2,4,7,9-tetramethyl-5-decin-4,7-diol (Gehalt in Formulierungen, vorzugsweise bei etwa 2%).

Die Fettsulfonate oder -sulfate liegen in der Regel als Alkali-, Erdalkali- oder gegebenenfalls unsubstituierte Ammoniumsalze vor und weisen einen Alkylrest mit 8 bis 22 C-Atomen auf, wobei Alkyl auch den Alkylteil von Acylresten einschließt, z. B. das Na- oder Ca-Salz der Ligninsulfonsäure, des Dodecylsulfats oder eines aus natürlichen Fettsäuren hergestellten

Fettalkoholsulfatgemisches. Hierher gehören auch die Salze der Schwefelsäureester und Sulfonsäuren von Fettalkohol-Ethylenoxid-Addukten. Die sulfonierten Benzimidazol-derivate enthalten vorzugsweise 2 Sulfonsäuregruppen und einen Fettsäurerest mit 8-22 C-Atomen. Alkylarylsulfonate sind z. B. die Na-, Ca- oder Triäthanolaminsalze der Dodecylbenzolsulfonsäure, der Dibutyl-naphthalinsulfonsäure oder eines Naphthalinsulfonsäure-Formaldehydkondensationsproduktes.

Ferner kommen auch entsprechende Phosphate, wie z. B. Salze des Phosphorsäureesters eines p-Nonylphenol-(4 bis 14)-ethylenoxid-Adduktes, in Frage.

Als nichtionische Tenside kommen in erster Linie Polyglykoletherderivate von aliphatischen oder cycloaliphatischen Alkoholen, gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren und Alkylphenolen in Frage, die 3 bis 30 Glykolethergruppen und 8 bis 20 Kohlenstoffatome im (aliphatischen) Kohlenwasserstoffrest und 6 bis 18 Kohlenstoffatome im Alkylrest der Alkylphenole enthalten können.

Weitere geeignete nichtionische Tenside sind die wasserlöslichen, 20 bis 250 Ethylenglykolethergruppen und 10 bis 100 Propylenglykolethergruppen enthaltenden Polyethylenoxid-Addukte an Polypropylenglykol,

Ethylendiaminopolypropylenglykol und Alkylpolypropylenglykol mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen in der Alkylkette. Die genannten Verbindungen enthalten üblicherweise pro Propylenglykoleinheit 1 bis 5 Ethylenglykoleinheiten.

Als Beispiele nicht-ionischer Tenside seien Nonylphenolpolyethoxyethanole, Ricinusölpolyglykolether, Polypropylen/Polyethylenoxid-Addukte, Tributylphenoxypolyethoxyethanol, Polyethylenglykol und Octylphenoxypolyethoxyethanol erwähnt. Ferner kommen auch Fettsäureester von Polyoxyethylensorbitan wie das Polyoxyethylensorbitan-trioleat in Betracht.

Bei den kationischen Tensiden handelt es sich vor allem um quartäre Ammoniumsalze, welche als N-Substituenten mindestens einen Alkylrest mit 8 bis 22 C-Atomen enthalten und als weitere Substituenten unsubstituierte oder halogenierte Nieder-Alkyl-, -Benzyl- oder niedrige Hydroxyalkylreste aufweisen. Die Salze liegen vorzugsweise als Halogenide, Methylsulfate oder Ethylsulfate vor, z. B. das Stearyltrimethylammoniumchlorid oder das Benzyl-di(2-chlorethyl)ethylammoniumbromid.

Die in der Formulierungstechnik gebräuchlichen Tenside sind u. a. in folgenden Publikationen beschrieben:

/38/1986 International McCutcheon's Emulsifiers & Detergents, The Manufacturing Confectioner Publishing Co., Glen Rock, NJ, USA; Helmut Stache „Tensid-Taschenbuch“ Carl Hanser-Verlag München/Wien 1981.

Die agrochemischen Mittel enthalten in der Regel 0,1 bis 99%, insbesondere 0,1 bis 95%, der transformierten, lebenden oder toten Bacillus-Zellen oder Mischungen davon, bzw. der von besagten transformierten Bacillus-Zellen produzierten Toxin-Proteinen, 99,9 bis 1%, insbesondere 99,8 bis 5%, eines festen oder flüssigen Zusatzstoffes und 0 bis 25%, insbesondere 0,1 bis 25%, eines Tensides.

Während als Handelsware eher konzentrierte Mittel bevorzugt werden, verwendet der Endverbraucher in der Regel verdünnte Formulierungen.

Solche Mittel können noch weitere Zusätze wie Stabilisatoren, Entschäumer, Viskositätsregulatoren, Bindemittel, Haftmittel sowie Dünger oder andere Wirkstoffe zur Erzielung spezieller Effekte enthalten.

Die transformierten lebenden oder toten Bacillus-Zellen oder Mischungen davon, die die rekombinanten *B. thuringiensis*-Toxin-Gene enthalten, sowie die von besagten transformierten Bacillus-Zellen produzierten Toxin-Proteine selbst sind hervorragend für die Bekämpfung von Schadinsekten geeignet. Vorzugsweise sind dabei pflanzenzerstörende Insekten der Ordnung Lepidoptera zu nennen, insbesondere solche der Gattungen *Pieris*, *Heliothis*, *Spodoptera* und *Plutella*, wie beispielsweise *Pieris brassicae*, *Heliothis virescens*, *Heliothis zea*, *Spodoptera littoralis* und *Plutella xylostella*.

Weitere Schadinsekten, die mit Hilfe der zuvor beschriebenen insektiziden Zubereitungen bekämpft werden können, sind beispielsweise Käfer der Ordnung Coleoptera, insbesondere solche der Familie Chrysomelidae, wie z. B. *Diabrotica undecimpunctata*, *D. longicornis*, *D. virgiter*, *D. undecimpunctata howardi*, *Agelastica culex*, *Leptinotarsa decemlineata* usw. sowie Insekten der Ordnung Diptera, wie beispielsweise *Anopheles sergentii*, *Uranatena unguiculata*, *Culex pipiens*, usw.

Die Aufwandmengen, in denen die Bacillus-Zellen, bzw. die von diesen produzierten Toxin-Proteine eingesetzt werden, hängen von den jeweiligen Bedingungen ab, wie beispielsweise den Witterungsverhältnissen, der Bodenbeschaffenheit, dem Pflanzenwachstum und dem Applikationszeitpunkt.

Formulierungsbeispiele für B. thuringiensis-Toxin enthaltendes Material

Bei den folgenden Formulierungsbeispielen sind unter dem Begriff „Bacillus-Zellen“ solche B. thuringiensis- und/oder B. cereus-Zellen zu verstehen, die ein erfindungsgemäß rekombinantes B. thuringiensis-Gen enthalten. (Bei den Angaben handelt es sich durchgehend um Gewichtsprozent.)

F 1. Granulate	a)	b)
Bacillus-Zellen und/oder von diesen produziertes Toxin-Protein	5%	10%
Kaolin	94%	-
Hochdisperse Kieselsäure	1%	-
Attapulgit	-	90%

Die Bacillus-Zellen und/oder von diesen produziertes Toxin-Protein werden zunächst in Methylenchlorid suspendiert, anschließend wird die Suspension auf das Trägermaterial aufgesprüht und danach das Suspendierungsmittel im Vakuum verdampft.

F 2. Stäubemittel	a)	b)
Bacillus-Zellen und/oder von diesen produziertes Toxin-Protein	2%	5%
Hochdisperse Kieselsäure	1%	5%
Talkum	97%	-
Kaolin	-	90%

Gebrauchsfertige Stäubemittel erhält man durch inniges Vermischen der Trägerstoffe mit den Bacillus-Zellen und/oder dem von diesen produzierten Toxin-Protein.

F 3. Spritzpulver	a)	b)	c)
Bacillus-Zellen und/oder von diesen produziertes Toxin-Protein	25%	50%	75%
Natrium-Ligninsulfonat	5%	5%	-
Natrium-Laurylsulfat	3%	-	5%
Natrium-Diisopropyl-naphthalinsulfonat	-	6%	10%
Octylphenolpolyethylenglykolether (7-8 Mole			
Ethylenoxid	-	2%	-
Hochdisperse Kieselsäure	5%	10%	10%
Kaolin	62%	27%	-

Die Bacillus-Zellen und/oder von diesen produziertes Toxin-Protein werden sorgfältig mit den Zusatzstoffen vermischt und das erhaltene Gemisch anschließend in einer geeigneten Mühle gut vermahlen.

Man erhält Spritzpulver, die sich mit Wasser zu Suspensionen jeder gewünschten Konzentration verdünnen lassen.

F 4. Extruder-Granulate	
Bacillus-Zellen und/oder von diesen produziertes Toxin-Protein	10%
Natrium-Ligninsulfonat	2%
Carboxymethylcellulose	1%
Kaolin	87%

Die Bacillus-Zellen und/oder von diesen produziertes Toxin-Protein werden mit den Hilfsstoffen gemischt, sorgfältig vermahlen und mit Wasser angefeuchtet. Dieses Gemisch wird extrudiert und anschließend in Luftstrom getrocknet.

F 5. Umhüllungsgranulat	
Bacillus-Zellen und/oder von diesen produziertes Toxin-Protein	3%
Polyethylenglykol 200	3%
Kaolin	94%

Die homogen vermischten Bacillus-Zellen und/oder von diesen produziertes Toxin-Protein werden in einem Mischer auf das mit Polyethylenglykol angefeuchtete Kaolin gleichmäßig aufgetragen. Auf diese Weise erhält man staubfreie Umhüllungsgranulate.

F6. Suspensionskonzentrat	
Bacillus-Zellen und/oder von diesen produziertes Toxin-Protein	40%
Ethylenglykol	10%
Nonylphenolpolyethylenglykol (15 Mole Ethylenoxid)	6%
Alkylbenzolsulfonsäure-triethanolaminsalz*	3%
Carboxymethylcellulose	1%
Silikonöl in Form einer 75%igen wäßrigen Emulsion	0,1%
Wasser	39%

* Alkyl ist vorzugsweise linear mit 10 bis 14, insbesondere 12-14 Kohlenstoffatomen wie beispielsweise n-Dodecylbenzolsulfonsäuretriethanolaminsalz.

Die homogen vermischten Bacillus-Zellen und/oder von diesen produziertes Toxin-Protein werden mit den Zusatzstoffen innig vermischt. Man erhält so ein Suspensionskonzentrat, aus welchem durch Verdünnen mit Wasser Suspensionen jeder gewünschten Konzentration hergestellt werden können.

Ausführungsbeispiele

Allgemeine rekombinante DNA-Techniken

Da viele der in dieser Erfindung genutzten rekombinanten DNA-Techniken Routine für den Fachmann sind, wird im folgenden eine kurze Beschreibung der allgemein gebräuchlichen Techniken gegeben, so daß auch diese allgemeinen Angaben im konkreten Ausführungsbeispiel verzichtet werden kann. Sofern nicht ausdrücklich darauf hingewiesen wird, sind alle diese Verfahren in der Referenz von /33/Maniatis et al., 1982 beschrieben.

A. Schneiden mit Restriktionsendonukleasen

Typischerweise sind etwa 50 µg/ml bis 500 µg/ml DNA in dem Reaktionsansatz enthalten, in der vom Hersteller, New England Biolabs, Beverly, MA., empfohlenen Pufferlösung. Für jedes µg DNA werden 2 bis 5 Einheiten von Restriktionsendonukleasen hinzugefügt und der Reaktionsansatz bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur für eine bis drei Stunden inkubiert. Die Reaktion wird durch 10minütiges Erhitzen auf 65°C oder durch Extraktion mit Phenol, gefolgt durch Präzipitation der DNA mit Ethanol, beendet. Diese Technik wird auch auf den Seiten 104 bis 106 der /33/Maniatis et al.-Referenz beschrieben.

B. Behandlung der DNA mit Polymerase, um glatte Enden zu erzeugen

50 µg/ml bis 500 µg/ml DNA-Fragmente werden zu einem Reaktionsansatz hinzugefügt, in dem vom Hersteller, New England Biolabs, empfohlenen Puffer. Der Reaktionsansatz enthält alle vier Desoxynukleotidtriphosphate in Konzentrationen von 0,2 mM. Nach Zusatz einer geeigneten DNA-Polymerase erfolgt die Reaktion während 30 Minuten bei 15°C und wird dann durch 10minütiges Erhitzen auf 65°C beendet. Für Fragmente, die durch Schneiden mit Restriktionsendonukleasen erhalten werden, welche 5'-überstehende Enden erzeugen, wie EcoRI und BamHI, wird das große Fragment, oder Klenow-Fragment, der DNA-Polymerase verwendet. Für Fragmente, die durch Endonukleasen erhalten werden, welche 3'-überstehende Enden erzeugen, wie PstI und SacI, wird die T4-DNA-Polymerase verwendet. Die Verwendung dieser beiden Enzyme wird auf den Seiten 113 bis 121 der /33/Maniatis et al.-Referenz beschrieben.

C. Agarose-Gelelektrophorese und Reinigung der DNA-Fragmenten von Gelverunreinigungen

Die Agarose-Gelelektrophorese wird in einer horizontalen Apparatur durchgeführt, wie dies auf den Seiten 150 bis 163 der /33/Maniatis et al.-Referenz beschrieben ist. Der verwendete Puffer entspricht dem dort beschriebenen Tris-Boat- oder Tris-Acetatpuffer. Die DNA-Fragmente werden durch 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, das entweder im Gel- oder im Tankpuffer während der Elektrophorese vorhanden ist oder aber wahlweise erst nach der Elektrophorese hinzugefügt wird. Die DNA wird durch Beleuchtung mit langwelligem Ultraviolettlicht sichtbar gemacht. Wenn die Fragmente vom Gel abgetrennt werden sollen, wird eine Agarose verwendet, die bei niedriger Temperatur geliert und von Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, bezogen werden kann. Nach der Elektrophorese wird das gewünschte Fragment ausgeschnitten, in ein Plastikröhrchen gegeben, etwa 15 Minuten auf 65°C erhitzt, dreimal mit Phenol extrahiert und zweimal mit Ethanol gefällt. Dieses Verfahren ist gegenüber dem von /33/Maniatis et al. auf Seite 170 beschriebenen leicht verändert. Als Alternative kann die DNA auch aus dem Agarosegel mit Hilfe des „GeneClean Kits“ (Bio 101 Inc., La Jolla, CA, US) isoliert werden.

D. Entfernen von 5'-terminalen Phosphaten von DNA-Fragmenten

Während der Plasmidklonierungsschritte vermindert eine Behandlung des Vektorplasmids mit Phosphatase die Rezirkularisation des Vektors (diskutiert auf Seite 13 der /33/Maniatis et al.-Referenz). Nach dem Schneiden der DNA mit der richtigen Restriktionsendonuklease wird eine Einheit alkalische Phosphatase aus dem Darm von Kälbern hinzugefügt, die von Boehringer-Mannheim, Mannheim, erworben werden kann. Die DNA wird eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal mit Phenol extrahiert und mit Ethanol gefällt.

E. Verknüpfen der DNA-Fragmente

Wenn Fragmente mit komplementären kohäsiven Enden miteinander verknüpft werden sollen, werden etwa 100 ng jedem Fragment in einem Reaktionsgemisch von 20 µl bis 40 µl mit etwa 0,2 Einheiten T4 DNA-Ligase von New England Biolabs im vom Hersteller empfohlenen Puffer inkubiert. Die Inkubation wird 1 bis 20 Stunden lang bei 15 °C durchgeführt. Wenn DNA-Fragmente mit glatten Enden verknüpft werden sollen, werden sie, wie oben beschrieben, inkubiert, wobei aber die Menge der T4 DNA-Ligase in diesem Fall auf 2 bis 4 Einheiten erhöht wird.

F. Die Transformation von DNA in E. coli

E. coli-Stamm HB 101 wird für die meisten Experimente verwendet. DNA wird mit dem Kalziumchloridverfahren, wie es von /33/Maniatis et al., Seiten 250 bis 251, beschrieben wurde, in *E. coli* eingeführt.

G. Screening von E. coli auf Plasmide

Nach der Transformation werden die resultierenden Kolonien von *E. coli* auf das Vorhandensein des gewünschten Plasmids durch ein schnelles Plasmidisolationsverfahren geprüft. Zwei gebräuchliche Verfahren werden auf den Seiten 366 bis 369 der /33/Maniatis et al.-Referenz beschrieben.

H. Isolierung von Plasmid-DNA in großem Maßstab

Verfahren zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* in großem Maßstab werden auf den Seiten 88 bis 94 der /33/Maniatis et al.-Referenz beschrieben.

Medien und Pufferlösungen

LB-Medium	(g/l)
Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	5
Antibiotic Medium Nr. 3 (Difco Laboratories)	(g/l)
Rinder Fleischextrakt	1,5
Hefeextrakt	1,5
Peptone	5
Glucose	1
NaCl	3,5
K ₂ HPO ₄	3,68
KH ₂ PO ₄	1,32
SCGY-Medium	(g/l)
Casaminoacids	1
Hefeextrakt	0,1
Glucose	5
K ₂ HPO ₄	14
KH ₂ PO ₄	6
Na ₃ -Citrat	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
GYS-Medium (/22/Yousten & Rogoff, 1969)	(g/l)
Glucose	1
Hefeextrakt	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,08
MnSO ₄ · H ₂ O	0,05
pH vor Autoklavieren auf 7,3 einstellen.	
PBS-Puffer	(mM)
Saccharose	400
MgCl ₂	1
Phosphat-Puffer, pH 6,0	7
TBST-Puffer	(mM)
Tween 20*	0,05% (w/v)
Tris/HCl* (pH 8,0)	10
NaCl	150

* Tween 20 Polyethoxysorbitanlaurat

* Tris/HCl α,α,α-Tris(hydroxymethyl)methylaminohydrochlorid

Die im Prioritätsdokument für die Benennung der Plasmide gewählte interne Bezeichnung pK wurde für die Auslandsfassung durch die offiziell anerkannte Bezeichnung pXI ersetzt.

Auch die Bezeichnung für die im Rahmen der Ausführungsbeispiele verwendete asporogene *B. thuringiensis*-HD1-Mutante wurde von cryB nach cryB geändert.

Beispiel 1: Transformation von *B. thuringiensis* mit Hilfe der Elektroporation

Beispiel 1.1: 10 ml eines LB-Mediums (Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, NaCl 5 g/l) werden mit Sporen von *B. thuringiensis* var. kurstaki HD1 cryB (/39/Stahly DP et al., 1978) einer plasmidfreien Variante von *B. thuringiensis* var. kurstaki HD1, inokuliert. Dieser Ansatz wird über Nacht bei einer Temperatur von 27°C auf einer Rundschüttelmaschine bei 50 Upm inkubiert. Danach wird die µg/ml Kultur in 100 ml bis 400 ml LB-Medium 100fach verdünnt und bei einer Temperatur von 30°C auf einer Rundschüttelmaschine bei 250 Upm weiter kultiviert, bis eine optische Dichte (OD_{650}) von 0,2 erreicht ist.

Die Zellen werden mit Hilfe einer Zentrifugation geerntet und in $1/40$ Volumen eines eisgekühlten PBS-Puffers (400 mM Saccharose, 1 mM $MgCl_2$, 7 mM Phosphat-Puffer pH 6,0) suspendiert. Die Zentrifugation und anschließende Suspension der geernteten *B. thuringiensis*-Zellen in PBS-Puffer wird einmal wiederholt.

Die so vorbehandelten Zellen können dann entweder direkt elektroporiert oder aber nach Zugabe von Glycerin in die Pufferlösung (20% (w/v)), bei -20°C bis -70°C aufbewahrt und zu einem späteren Zeitpunkt verwendet werden.

800 µl Aliquots der eisgekühlten Zellen werden dann in vorgekühlte Küvetten überführt, anschließend wird 0,2 µg pBC16-Plasmid DNA (/40/Bernhard K. et al., 1978) (20 µg/ml) zugegeben und der gesamte Ansatz 10 Minuten bei 4°C inkubiert.

Bei Verwendung von tiefgekühltem Zellmaterial wird zunächst ein geeignetes Aliquot gefrorener Zellen in Eis oder bei Raumtemperatur aufgetaut. Die weitere Behandlung erfolgt analog dem Vorgehen bei Verwendung frischen Zellmaterials. Danach wird die Küvette in eine Elektroporationsapparatur eingebracht und die in der Suspension vorliegenden *B. thuringiensis*-Zellen werden einer Elektroporation unterzogen, indem sie durch einmaliges Entladen eines Kondensators mit Spannungen zwischen 0,1 kV und 2,5 kV beaufschlagt werden.

Der hier verwendete Kondensator weist eine Kapazität von 25 µF auf, die Küvetten haben einen Elektrodenabstand von 0,4 cm, was bei einer Entladung je nach Einstellung zu einer exponentiell abnehmenden Feldstärke mit anfänglichen Spitzenwerten von 0,25 kV/cm bis 6,25 kV/cm führt. Die exponentielle Abklingzeit liegt in einem Bereich zwischen 10 ms und 12 ms.

Für die beschriebenen Elektroporationsversuche kann beispielsweise ein Elektroporationsgerät der Firma Bio Rad verwendet werden („Gene Pulser Apparatus“, # 165-2075, Bio Rad, 1414 Harbour Way South, Richmond, CA 94804, USA).

Selbstverständlich ist auch jedes andere geeignete Gerät in dem erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbar.

Nach einer weiteren 10minütigen Inkubation bei 4°C wird die Zellsuspension mit 1,2 ml LB-Medium verdünnt und 2 Stunden bei einer Temperatur von 30°C auf einer Rundschüttelmaschine bei 250 Upm inkubiert.

Anschließend werden geeignete Verdünnungen auf LB-Agar (LB-Medium verfestigt mit Agar, 15 g/l) ausplattiert, der ein für die Selektion des neuerhaltenen Plasmids geeignetes Antibiotikum als Zusatz enthält. Im Falle von pBC16 handelt es sich dabei um Tetracyclin, das dem Medium in einer Konzentration von 20 mg/l zugegeben wird.

Die für *B. thuringiensis*-HD1 cryB und -pBC16 in Abhängigkeit der angelegten Ausgangsspannung bei gegebenem

Plattenabstand erzielten Transformationsfrequenzen sind in Abbildung 1 wiedergegeben.

Die Expression der eingeschleusten DNA kann anhand der auftretenden Tetracyclinresistenz nachgewiesen werden. Bereits 2 Stunden nach der Transformation von pBC16 in *B. thuringiensis* erfolgt eine vollständige phänotypische Expression der neu eingeführten Tetracyclin-Resistenz (siehe Tabelle 2).

Beispiel 1.2: Die Transformation von *B. thuringiensis*-Zellen wird in genau analoger Weise zu Beispiel 1.1. durchgeführt, mit der Ausnahme, daß das Volumen, der für die Elektroporation vorgesehenen Zellsuspension, in diesem Fall 400 µl beträgt.

Durch diese Verfahrensmaßnahme kann die Transformationsfrequenz um den Faktor 10 erhöht werden.

Beispiel 2: Transformation von *B. thuringiensis* HD1 cryB mit einer Reihe verschiedener Plasmide

Die meisten Versuche werden mit dem Plasmid pBC16 durchgeführt, einem natürlich vorkommenden Plasmid aus *B. cereus*. Daneben können aber auch andere natürlich vorkommende Plasmide erfolgreich in *B. thuringiensis*-Zellen eingeschleust werden, wie z. B. pUB110 (/25/Polack, J., und Novik, R.P., 1982), pC194 (/24/Horinouchi, S., und Weisblum, B., 1982) und pIM13 (/26/Mahler, I., und Halvorson, H.O., 1980) (siehe Tabelle 3).

Auch Varianten dieser Plasmide, die besser geeignet sind für die Arbeiten mit rekombinanter DNA als die natürlichen Isolate lassen sich mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens in den *B. thuringiensis*-Stamm HD1 cryB transformieren, wie z. B. der *B. subtilis* Klonierungsvektor pBD64 (/27/Gryczan, T., et al., 1980) sowie die Plasmide pBD347, pBD348 und pUB1664 (siehe Tabelle 3; die Plasmide pBD347, pBD348 und pUB1664 können von Dr. W. Schurter, CIBA-GEIGY AG, Basel bezogen werden). Die Transformationsergebnisse der Tabelle 3 machen deutlich, daß unabhängig von der verwendeten Plasmid-DNA bei Anwendung des erfindungsgemäßen Transformationsverfahrens Transformationsfrequenzen erreicht werden, die – mit einer Ausnahme – alle im Bereich zwischen 10^5 bis 10^7 liegen.

Beispiel 3: Konstruktion eines „Shuttle“-vektors für *Bacillus thuringiensis*

Bestehende bifunktionelle Vektoren für *E. coli* und *B. subtilis* wie z. B. pHV33 (/41/Primrose, S.B., und Ehrlich, S.D., Plasmid, 6: 193-201, 1981) sind für *B. thuringiensis* HD1 cryB nicht geeignet (siehe Tabelle 3).

Für die Konstruktion eines potenten bifunktionellen Vektors wird zunächst das große EcoRI-Fragment von pBC16 mit Hilfe von T4 DNA-Ligase in die EcoRI-Stelle des Plasmids pUC8 (/28/Vieira, J., und Messing, J., 1982) eingespleist. Anschließend werden *E. coli*-Zellen mit diesem Konstrukt transformiert. Eine mit Hilfe einer Restriktionsanalyse als korrekt erkannte Konstruktion wird pXI62 genannt.

Es folgt die Entfernung der distal der pUC8 Polylinkerregion gelegenen EcoRI Schnittstelle. Durch eine partielle EcoRI-Verdauung wird pXI62 linearisiert. Die kohäsiven EcoRI-Enden werden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und mit T4 DNA-Ligase wieder zusammengesetzt. Nach Transformation in *E. coli* wird eine mit Hilfe einer Restriktionsanalyse als richtig erkannte Konstruktion ausgewählt und pXI61 genannt. Eine Karte von pXI61 mit den Schnittstellen von Restriktionsenzymen, die pXI61 nur einmal schneiden, ist in Abbildung 3 gezeigt.

Diese Konstruktion läßt sich mit Hilfe der in Beispiel 1 beschriebenen Transformationsmethode direkt in *B. thuringiensis* HD1 cryB transformieren.

Aufgrund starker Restriktionsbarrieren in *B. thuringiensis* Stämmen liegen die Transformationsraten in diesem Fall bei Verwendung der aus *E. coli* stammenden pXI61 DNA niedriger als bei Verwendung der aus *B. thuringiensis* HD1 cryB stammenden Plasmid-DNA (siehe Tabelle 3). Dennoch erweist sich pXI61 als sehr geeignet für die Durchführung von Klonierungsexperimenten in *B. thuringiensis*.

Beispiel 4: Einschleusung der Kurhd 1 delta-Endotoxingens in Stämmen von *B. thuringiensis* und *B. cereus*

Die im Rahmen dieser Erfindung für die Einschleusung und Expression in *B. thuringiensis* bzw. *B. cereus* verwendete DNA-Sequenz, die für ein kurhd 1 delta-Endotoxin-Protein kodiert, stammt aus dem Plasmid pK36, das mit Datum vom 4. März 1986 bei der als internationale Hinterlegungsstelle anerkannten Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, BRD, entsprechend den Anforderungen des Budapestar Vertrages für die Internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke der Patentierung unter der Hinterlegungsnummer DSM3668 hinterlegt wurde.

Eine detaillierte Beschreibung der Verfahren zur Identifizierung und Isolierung der δ -Endotoxin-Gene sowie der Konstruktion des Plasmids pK36 ist in der Europäischen Patentanmeldung EP 0238441 enthalten und in Form einer Referenz ein Bestandteil der vorliegenden Erfindung.

pK36 Plasmid DNA wird mit den Restriktionsenzymen Pst 1 und BamH 1 komplett verdaut und das 4.3Kb umfassende Fragment, das das Kurhd 1 delta-Endotoxingen (vgl. Formel I) enthält, aus einem Agarosegel isoliert. Dieses Fragment wird dann in pXI61 eingespleißt, welches zuvor mit Pst 1 und BamH 1 verdaut und mit alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm behandelt wurde. Nach der Transformation von *E. coli* HB 101 wird ein mit Hilfe einer Restriktionsanalyse als korrekt erkannte Konstruktion isoliert, die die Bezeichnung pXI93 erhält. Eine Restriktionskarte von pXI93 ist in Abbildung 7 wiedergegeben.

pXI93 kann auf 2 verschiedenen Wegen in *B. thuringiensis* HD 1 cryB eingebracht werden.

a) *B. thuringiensis* Zellen werden direkt mit einem pXI93 Isolat aus *E. coli* mit Hilfe des in Beispiel 1 beschriebenen erfindungsgemäßen Transformationsverfahrens transformiert.

b) pXI93 wird zunächst in *B. subtilis* Zellen transformiert, wie bei Chang und Cohen, 1979 beschrieben. Aus einem Transformanten, der die komplette und intakte pXI93 Plasmid DNA enthält, wird diese isoliert und anschließend mit Hilfe der in Beispiel 1 beschriebenen Elektroporationsmethode in *B. thuringiensis* HD 1 cryB transformiert.

Die Anwendung beider Verfahren führt zu Transformanten, die das intakte pXI93 Plasmid enthalten, was anhand einer Restriktionsanalyse gezeigt werden kann.

Beispiel 5: Nachweis der Expression des delta-Endotoxingens in *B. thuringiensis*

Sporulierende Kulturen von *B. thuringiensis* HD 1 cryB, HD 1 cryB (pXI61) und HD 1 cryB (pXI93) und HD 1 werden im Phasenkontrastmikroskop bei 400facher Vergrößerung miteinander verglichen. Nur im pXI93 und in HD 1 enthaltenden Stamm können die typischen bipyramidalen Proteinkristalle nachgewiesen werden. Extrakte aus den selben Kulturen werden auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nur für den das Plasmid pXI93 und bei HD 1 enthaltenden Stamm konnte auf dem Gel eine Proteinbande von 130000 Dalton nachgewiesen werden, die dem Kurhd 1 Genprodukt entspricht (Abbildung 8a).

In der „Western blot“ Analyse (Abbildung 8b) reagiert dieses 130000 Dalton Protein und seine Abbauprodukte spezifisch mit polyklonalen Antikörpern, die zuvor gegen Kristallprotein aus *B. thuringiensis* var. Kurstaki HD 1 gemäß bei /42/Huber-Lukac, H., 1982 beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Eine detaillierte Beschreibung dieses Verfahrens findet man in der Europäischen Patentanmeldung EP 238,441, die in Form einer Referenz ein Bestandteil dieser Erfindung ist. Auf dem Plasmid pXI93 befindet sich stromaufwärts der Toxin-kodierenden Region ein 156Bp umfassender DNA Abschnitt, der den vorbeschriebenen Sporulation-abhängigen Tcdem-Promotor (/29/Wong, H.C., et al, 1983), enthält. Diese Sequenz ist ausreichend für eine hohe Expression des delta-Endotoxingens in *B. thuringiensis* HD 1 cryB und *B. cereus* 569K.

Beispiel 6: Nachweis der Toxizität des rekombinanten *B. thuringiensis* HD 1 cryB (pXI93)

B. thuringiensis HD 1 cryB und HD 1 cryB (pXI93) werden bei 25°C in Sporulationsmedium (GYS-Medium) gezüchtet. Nach vollständiger Sporulation, die im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert wird, werden Sporen und (soweit vorhanden) Prototoxinkristalle durch Zentrifugation geerntet und Sprüh-getrocknet. Das daraus resultierende Pulver wird in verschiedenen Konzentrationen der Diät von *L-1* Larven von *Heliothis virescens* (tobacco budworm) beigemischt. Die Mortalität der Larven wird nach sechs Tagen bestimmt.

Wie erwartet ist der Protoxingen-freie Stamm HD 1 cryB nicht toxisch für *Heliothis virescens*, während der mit Plasmid pXI93 transformierte Stamm eine Dosis-abhängige Mortalität von *H. virescens* verursacht (Tabelle 4). Dies zeigt, daß durch das Elektroporationsverfahren hergestellte rekombinante Stämme tatsächlich als Bioinsektizid verwendet werden können.

Beispiel 7: Elektroporation verschiedener *B. thuringiensis* und *B. spec.* Stämme

Das unter Beispiel 1 beschriebene Transformationsprotokoll für *B. thuringiensis* HD 1 cryB läßt sich auch auf andere Stämme anwenden.

Alle getesteten Stämme von *B. thuringiensis* var. kurstaki lassen sich mit dieser Methode sehr einfach und effizient transformieren (Tabelle 5).

Mit einem Laborstamm von *B. cereus* können ebenfalls ausgezeichnete Transformationsfrequenzen erreicht werden. Das gleiche gilt auch für weitere der getesteten *B. thuringiensis* Varietäten (var. israelensis, var. kurstaki). *B. subtilis* dagegen läßt sich durch das Elektroporationsverfahren nur sehr mangelhaft transformieren.

Bei Anwendung der Proteoplasten-abhängigen PEG-Methode konnte dagegen mit *B. subtilis* Transformationsraten von $4 \times 10^6/\mu\text{g}$ Plasmid DNA erreicht werden.

Die niedrigen Transformationsraten von *B. subtilis* bei Anwendung der Elektroporationstechnik stehen nicht im Zusammenhang mit falsch gewählten Parametern, wie z. B. einer ungeeigneten Spannung oder mit einer hohen Mortalitätsrate, verursacht durch elektrische Impulse, wie anhand der Abb. 9 ersichtlich ist.

Beispiel 8: Transformation von *B. thuringiensis* HD 1 cry^P mit dem β -Galaktosidasegen

8.1. Einbau einer BamHI-Restriktionsschnittstelle unmittelbar vor das erste AUG – Kodon des *B. thuringiensis* Protoxingens

Bevor das β -Galaktosidase Gen aus dem Plasmid piWith5 (erhältlich von Dr. M. Geiser, CIBA-GEIGY AG, Basel, Schweiz) mit dem Promotor des Kurhd 1 δ -Endotoxingens aus *B. thuringiensis* verknüpft werden kann, muß zunächst die in der Umgebung des AUG Startkodons befindliche DNA Sequenz des Protoxingens modifiziert werden.

Diese Modifikation wird mit Hilfe einer Oligonukleotid-vermittelten Mutagenese durchgeführt, unter Verwendung des einzelsträngigen Phagen M13mp8, der das 1.8kb umfassende HincII-HindIII Fragment aus dem δ -Endotoxingen, das die 5'-Region des Toxingens umfaßt, enthält.

Zunächst werden 3µg des Plasmids pK36 (vgl. Beispiel 4) mit den Restriktionsenzymen HindIII und HincII verdaut. Das resultierende 1.8kb-Fragment wird über eine Agarosegelelektrophorese gereinigt und anschließend aus dem Gel isoliert. Parallel dazu werden 100ng M13mp8 RF Phagen-DNA (Biolab, Tozer Road, Beverly MA, 01915, USA oder jeder beliebige Hersteller) mit den Restriktionsenzymen SmaI und HindIII verdaut, phenoisiert und durch Zugabe von Ethanol präzipitiert. Die so behandelte Phagen-DNA wird dann mit 200ng des zuvor isolierten Protoxin-Fragmentes vermischt und durch Zugabe von T4 DNA Ligase mit diesem verknüpft.

Nach der Transfektion von *E. coli* JM 103 werden 6 weiße Plaques herausgelesen und mit Hilfe einer Restriktionskartierung analysiert.

Ein Isolat, bei dem die Verknüpfung zwischen dem β -Galaktosidase Gen und dem Promotor des Kurhd 1 δ -Endotoxingens aus *B. thuringiensis* korrekt erfolgt ist, wird ausgelesen und erhält die Bezeichnung M13mp8/Hinc-Hind.

Mit Hilfe eines DNA-Synthesoapparates („APPLIED BIOSYSTEM DNA SYNTHESIZER“) wird ein Oligonukleotid synthetisiert, das die folgende Sequenz aufweist:

(5') GTTCGGATTGGGATCCATAAG (3')

Dieses synthetische Oligonukleotid ist einer Region auf der M13mp8/Hinc-Hind DNA komplementär, die von Position 153 bis Position 173 des Kurhd 1 δ -Endotoxingens reicht (vgl. Formel I). Die oben wiedergegebene Oligonukleotidsequenz weist jedoch in Position 162 und 163 ein „Mismatch“ gegenüber der in Formel I wiedergegebenen Sequenz auf, wodurch es zur Ausbildung einer BamHI Restriktionsschnittstelle kommt. Die allgemeine Vorgehensweise bei der Mutagenese ist bei J.M. Zoller und M. Smith (/43/J.M. Zoller and M. Smith; 19) beschrieben. Etwa 5µg einzelsträngiger M13mp8/Hinc-Hind Phagen DNA wird mit 0,3µg phosphorylierten Oligonukleotiden in einem Gesamt-Volumen von 40µl gemischt. Diese Mischung wird für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, dann zunächst auf 50°C abgekühlt und anschließend allmählich auf 4°C heruntergekühlt. Danach werden Puffer, Nucleotidtriphosphate, ATP, T4-DNA-Ligase und das große Fragment der DNA-Polymerase hinzugefügt und über Nacht bei 15°C, wie beschrieben (/43/J.M. Zoller and M. Smith) inkubiert. Nach einer Agarosegelelektrophorese wird zirkuläre doppelsträngige DNA gereinigt und mittels Transfektion in den *E. coli* Stamm JM 103 eingeschleust. Alternativ dazu kann auch der *E. coli* Stamm JM 107 verwendet werden.

Die resultierenden Plaques werden auf Sequenzen hin untersucht, die mit ³²P-markiertem Oligonukleotid hybridisieren; die Phagen werden mit Hilfe der DNA Restriktionsendonukleasen-Analyse untersucht.

Ein Phage, der eine korrekte Konstruktion enthält, bei der sich eine BamHI Schnittstelle unmittelbar vor dem ersten AUG Kodon des Protoxingens befindet, wird mit M13mp8/Hinc-Hind/BamHI bezeichnet.

8.2 Verknüpfung des β -Galaktosidasegens mit dem δ -Endotoxin-Promotor

8.2.1: Der δ -Endotoxin Promotor befindet sich auf einem 162 Bp umfassenden EcoRI/BamHI Fragment der M13mp8/Hinc-Hind/Bam-Phagen DNA. RF-Phagen DNA wird mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut. Die dadurch an den 5'-Enden entstehenden Überhänge werden durch Behandlung mit „Mung Bean“-Nuklease (Biolabs) gemäß den Angaben des Herstellers entfernt. Danach wird die DNA mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut und das 162 Bp umfassende Fragment nach Durchführung einer Agarosegelelektrophorese aus dem Agarosegel isoliert.

Das β -Galaktosidasegen wird aus dem Plasmid piWith5 isoliert. piWith5 DNA wird zunächst an der einzigen HindIII Schnittstelle geschnitten. Die 3' ausgesparten Enden werden mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA Polymerase aufgefüllt (vgl./33/ Maniatis et al., 1983, Seite 113-114) und die modifizierte DNA wird anschließend mit dem Restriktionsenzym Sall verdaut. Das DNA-Fragment, welches das β -Galaktosidasegen enthält wird mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese isoliert.

Der Vektor pXI61 (vgl. Beispiel 3) wird mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sall verdaut und die beiden zuvor isolierten Fragmente werden in den Vektor pXI61 eingespleißt.

Nach der Transformation dieser Ligationsmischung in den *E. coli* Stamm HB 101 bzw. JM 107 werden die korrekt verknüpften Zellklone mit Hilfe der Restriktionsanalyse und anhand ihrer β -Galaktosidaseaktivität gegenüber dem chromogenen Substrat X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid) selektioniert. Ein Klon, der eine korrekte genetische Konstruktion enthält wird mit pXI80 bezeichnet.

8.2.2.: In einer alternativen Ausführungsform wird das 162 Bp umfassende EcoRI/BamHI Fragment, welches den δ -Endotoxin Promotor enthält, durch Schneiden von M13mp8/Hinc-Hind/Bam mit EcoRI und BamHI und anschließende gelelektrophoretische Auftrennung isoliert.

Das β -Galaktosidasegen wird auch in diesem Fall aus dem Plasmid piWith5 isoliert (vgl. Beispiel 8.1.). Die Plasmid DNA wird dabei mit den Restriktionsenzymen BamHI und BglII verdaut und das große Fragment nach Gelelektrophorese aus dem Agarosegel eluiert.

Der Vektor phy300 PLK (#PHY-001 Toyobo Co., Ltd., 2-8 Dojima Hama 2-Chome, Kita-ku, Osaka, 530 Japan), der kommerziell bezogen werden kann (vgl. Beispiel 9.1.), wird mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BglII verdaut. Die beiden zuvor isolierten Fragmente werden dann in den Vektor phy300 PLK eingespleißt.

Die gesamte Ligationsmischung wird anschließend in den *E. coli* Stamm JM 107 (Bethesda Research Laboratories [BRL], 411 N, Stonestreet Avenue, Rockville, MD 20850, USA) transformiert. Ein Klon, der eine β -Galaktosidaseaktivität aufweist wird weiter mit Hilfe von Restriktionsverdauungen analysiert. Ein Klon, der eine korrekte genetische Konstruktion enthält, wird mit pXI101 bezeichnet.

8.3. Transformation des Plasmids pXI80 bzw. pXI101 in *B. subtilis* und *B. thuringiensis*

pXI80 bzw. pXI101 Plasmid DNA wird zunächst gemäß einem bekannten, bei Chang und Cohen beschriebenen Versuchsprotokoll (/13/Chang und Cohen, 1979), in *B. subtilis* Protoplasten transformiert.

Ein korrekter Klon wird ausgelesen, die zu transformierende DNA mit Hilfe von Standardverfahren isoliert und via Elektroporation (vgl. Beispiel 1) in *B. thuringiensis* HD 1 cryB Zellen transformiert.

Die transformierten *B. thuringiensis* Zellen werden auf GYS-Agar (Sporulationsmedium), der X-gal als Zusatz enthält, ausplattiert.

Korrekt transformierte Klone färben sich beim Einsetzen der Sporulation blau.

Ein *B. thuringiensis* HD 1 cryB Stamm, der mit dem pXI81 Vektor transformiert wird, bleibt dagegen unter den gleichen Bedingungen weiß.

Die Restriktionsanalyse zeigt, daß bei korrekt transformierten Klone ein intaktes pXI80 bzw. pXI101 Plasmid in den *B. thuringiensis* Zellen vorliegt.

3.4. β -Galaktosidasegen unter der Kontrolle eines Sporulationsabhängigen Promotors

B. thuringiensis HD 1 cryB Zellen, die das pXI80 bzw. pXI101 Plasmid enthalten, werden wie zuvor beschrieben auf GYS-Medium kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Wachstumsphase (sowohl während der vegetativen Wachstumsphase als auch während der Sporulationsphase) wird ein β -Galaktosidase-Assay gemäß dem bei /44/J.H. Miller beschriebenen Versuchsprotokoll („Experiments in Molecular Genetics“, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972, Experiment 48 und 49) durchgeführt.

Die einzigen Unterschiede zu dem oben erwähnten Versuchsprotokoll beziehen sich auf die Verwendung von X-gal als chromogenes Substrat und auf die Messung des farbigen Hydrolyseproduktes, das von den Zellen nach etwa 1 Stunde gebildet wird.

Die Zellen werden anschließend mit Hilfe einer Zentrifugation entfernt und die optische Dichte des Überstandes wird bei einer Wellenlänge von 650nm bestimmt (OD_{650}).

Es zeigt sich, daß die Zunahme der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Sporulation erfolgt. Die nicht-transformierten *B. thuringiensis* Zellen können dagegen das chromogene Substrat X-gal nicht hydrolysieren.

Beispiel 9: Erstellen von Genbanken in *Bacillus thuringiensis*

9.1. Konstruktion von pXI200

Das Plasmid pXI200 ist ein Derivat des Plasmids pHY300 PLK, das von Toyobo Co., Ltd. (#PHY-001; Toyobo Co., Ltd., 2-8 Dojima Hama 2-Chome, Kita-ku, Osaka, 530 Japan) kommerziell bezogen werden kann. Plasmid pHY300, dessen Konstruktion in der Europäischen Patentanmeldung EP 162725 beschrieben ist, enthält sowohl ein Ampicillin (amp^R)- als auch ein Tetrazyclin ($tetr^R$)-Resistenzgen.

Das Plasmid pHY300 PLK wird mit BglI und PvuI vollständig verdaut. Die resultierenden Restriktionsfragmente werden anschließend mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Das 4.4 Kb Fragment wird aus dem Agarosegel isoliert, gereinigt und anschließend mit T4 DNA-Ligase religiert.

Der gesamte Ligationsansatz wird in *E. coli* HB101 transformiert. Nach Inkubation der transformierten *E. coli* HB101 Zellen bei 37°C auf einem selektiven L-Agar, der 20 μ g/ml Tetrazyclin enthält, werden die Tetrazyclin-resistenten (Tc^R) Transformanten selektioniert. Aus einem Ampicillin sensitiven (Ap^R) Klon (100 μ g/ml Ampicillin) kann dann ein Plasmid isoliert werden, das die PstI Schnittstelle im Ap^R -Gen zusammen mit dem 0,3Kb umfassenden PvuI/BglI Fragment verloren hat. Dieses Plasmid erhält die Bezeichnung pXI200.

9.2. Klonierung von Protoxingenen aus *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HDI in *Bacillus thuringiensis* HDI cryB

Die Gesamt-DNA (50 μ g) von *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HDI wird durch Inkubation mit den Restriktionsenzymen PstI und HpaI vollständig verdaut. Die so gewonnenen Restriktionsfragmente werden auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (5% [w/v] – 23% [w/v]) übertragen und dort mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und in Fraktionen von je 500 μ l gesammelt. Die Zentrifugation wird in einem TST 41-Rotor (Kontroll-Ausschwingrotor) bei max. $2,4 \times 10^5$ g über einen Zeitraum von 16 Stunden und bei einer Temperatur von 15°C durchgeführt. Anschließend werden je 50 μ l Aliquots zur Bestimmung der Fragmentgröße auf ein Agarosegel (0,8% [w/v] Agarose in Tris Acetat EDTA oder Tris Borat EDTA; siehe /33/ Maniatis et al., 1982) übertragen. Diejenigen Fraktionen, welche Fragmente zwischen 3Kb und 6Kb enthalten werden gepoolt und durch Ethanol-fällung auf ein Volumen von 10 μ l konzentriert.

5 μ g des in Beispiel 9.1. beschriebenen „Shuttle“ Vektors pXI200 werden mit den Restriktionsenzym PstI und SmaI vollständig verdaut. Die 5'-Phosphatgruppen der resultierenden Restriktionsfragmente werden anschließend durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm entfernt.

0,2 μ g bis 0,3 μ g der zuvor isolierten HDI DNA werden anschließend mit 0,5 μ g pXI200 vektor DNA vermischt und unter Zugabe von 0,1 U (sog. „Weiss Units“; eine Einheit T4 DNA-Ligase entspricht einer Enzymaktivität, die ausreicht 1 nM [32 P] aus Pyrophosphat bei einer Temperatur von 37°C und innerhalb eines Zeitraumes von 20 Minuten in ein Norit-absorbierbares Material umzuwandeln) T4 DNA-Ligase über Nacht bei 14°C inkubiert. Der gesamte Ligationsansatz wird anschließend durch Elektroporation (vgl. Beispiel 1) direkt in *Bacillus thuringiensis* HDI cryB-Zellen transformiert. Die elektroporierten *B. thuringiensis* Zellen werden dann auf einen selektiven Sporulationsagar, der 20 μ g/ml Tetrazyclin als Selektionsmittel enthält, ausplattiert und bei einer Temperatur von 25°C bis zur vollständigen Sporulation inkubiert.

9.3. Herstellung monoklonaler Antikörper gegen *B. thuringiensis* Protoxinprotein

Die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen δ -Endotoxin aus *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HDI wird analog der Beschreibung bei /36/ Huber-Lukač, (1984) bzw. bei /37/ Huber-Lukač et al. (1986) durchgeführt.

Bei den für die Antikörperherstellung verwendeten Hybridoma-Zellen handelt es sich um Fusionsprodukte von Sp2/0-Ag Myelomzellen (beschrieben bei /45/ Shulman et al., 1978; kann bei der „American Type Culture Collection“ in Rockville, Maryland, USA bezogen werden) und Milzlymphozyten von BALB/c Mäusen, die zuvor mit δ -Endotoxin und *B. thuringiensis* *kurstaki* HDI immunisiert wurden.

Auf diese Weise können monoklonale Antikörper erhalten werden, die spezifisch gegen das δ -Endotoxin von *B. thuringiensis* gerichtet sind. Besonders bevorzugt sind monoklonale Antikörper, die entweder spezifisch an ein Epitop in der N-terminalen Hälfte des Protoxin-Proteins binden (z. B. Antikörper 54.1 der Huber-Lukač et al., 1986 Referenz) oder aber ein Epitop in dem bei Lepidopteren-aktiven Protoxinen konstanten Teil des Proteins, der C-terminalen Hälfte (z. B. Antikörper 83.16 der Huber-Lukač et al., 1986 Referenz), erkennen.

Es können aber durchaus auch andere monoklonale oder auch polyklonale Antikörper für das sich anschließende Immunscrening (vgl. Beispiel 9.4.) verwendet werden.

9.4. Immunologisches Screening

Für das immunologische Screening werden die gemäß Beispiel 9.3. hergestellten oder andere geeignete monoklonalen Antikörper verwendet.

Zunächst werden die nach der Sporulation der *B. thuringiensis* Zellen frei vorliegenden Kristallproteine mit Hilfe von Transfer Membranen (z. B. Pall Biodyne Transfer-Membran; Pall Ultrafine Filtration Corporation, Glen Cove, N. Y.) gebunden, indem diese für einen Zeitraum von etwa 5 Minuten auf die Platten aufgelegt werden. Die Filter werden danach 5 Minuten mit TBST Puffer (0,05% [w/v] Tween 20, 10mM Tris/HCl [pH 8,0], 150mM NaCl in H₂O bidest.) gewaschen und anschließend für 15 bis 30 Minuten zur Blockierung unspezifischer Bindungen in einem Gemisch aus TBST Puffer und 1% (w/v) Magermilch inkubiert.

Die so vorbereiteten Filter werden dann über Nacht mit dem Protoxinspezifischen Antikörpern (Antikörpergemisch aus 54,1 und 83,1/37/ Huber-Lukač et al., [1986]) inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper werden durch dreimaliges Waschen des Filters mit TBST Puffer während jeweils 5 bis 10 Minuten entfernt. Zum Nachweis des Antikörpergebundenen Protoxins werden die Filter mit einem weiteren Antikörper inkubiert. Als sekundärer Antikörper fungiert dabei ein mit alkalischer Phosphatase markierter Antikörper, der beispielsweise bei Bio-Rad (Katalog # 170-6520, Ziegen anti-Maus IgG[H+L]-alkalische Phosphatase Konjugat) kommerziell erworben werden kann. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten werden die nicht gebundenen sekundären Antikörper, wie zuvor beschrieben, durch dreimaliges Waschen (jeweils 5 bis 10 Minuten) mit Filter mit TBST Puffer entfernt. Anschließend werden die Filter mit einem Substratgemisch bestehend aus NBT ('p-nitro blue tetrazolium chloride; Nitro-Blaues Tetrazoliumchlorid) und BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidin Salz] inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird gemäß den Angaben des Hersteller (Bio-Rad; 1414 Harbour Way South, Richmond CA, 94804, USA) durchgeführt.

Positive, d. h. Protoxin-haltige Klone, können sehr einfach anhand ihrer violetten Färbung erkannt werden. Diese kommt zustande durch die enzymatische Reaktion der alkalischen Phosphatase mit dem zuvor erwähnten Substratgemisch. Aus der in Beispiel 9.2. beschriebenen Transformation mit dem dort angegebenen Ligationsansatz resultierten zwischen 800 und 1000 Transformanten. Davon zeigen 2 Kolonien eindeutig positive Signale in der zuvor beschriebenen Enzymreaktion.

Aus positiven Klonen, bei denen anhand der beschriebenen Enzymreaktion eine Expression des Protoxingens nachgewiesen werden konnte, wird Plasmid DNA isoliert. Mit Hilfe der Restriktionsanalyse und durch Vergleich mit bekannten Restriktionskarten können die klonierten Protoxingene weiter charakterisiert und schließlich identifiziert werden.

Beide Klone enthalten ein rekombinantes Plasmid mit einem Insert von 4.3 Kb. Die folgenden Restriktionsverdauungen mit HindIII, PvuII, EcoRI und XbaI erlauben eine Identifizierung des Gens auf dem Insert durch Vergleich mit den bekannten Restriktionskarten der Endotoxingene aus *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD1. Es handelt sich in beiden Fällen um das kurhd1 Gen, das auch als 5.3Kb Protoxinogen bekannt und bei/5/ Geiser et al., 1986 beschrieben ist.

Dieses direkt in *B. thuringiensis* klonierte und mit Hilfe eines immunologischen Screenings identifizierte Gen hybridisiert darüber hinaus mit einem 1847 Bp umfassenden BamHI/HindIII Fragment des 5.3Kb Gens im Plasmid pK36/5/ Geiser et al., 1986). Im SDS/PAGE zeigen beide Klone eine für das Protoxin typischen Bande von 130000 Dalton, die im Western Blot/46/ Towbin et al., 1979) spezifische mit den zuvor beschriebenen (siehe Beispiel 9.4.) monoklonalen Antikörpern reagieren.

Tabellen

Tabelle 1:

Einfluß der Inkubationszeit bei 4°C vor und nach der Elektroporation auf die Transformationsfrequenz. *B. thuringiensis* HD1 cryB wurde mit Hilfe der Elektroporationsmethode mit 0,2µg pBC16 pro Ansatz transformiert

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8
Vorinkubation* (Minuten)	0	5	10	20	20	20	20	20
Nachinkubation** (Minuten)	20	20	20	20	0	5	10	20
Transformationsfrequenz (Transformanten/µg Plasmid DNA)	2,6 × 10 ⁶	2,1 × 10 ⁶	2,2 × 10 ⁶	2,3 × 10 ⁶	2,5 × 10 ⁶	1,9 × 10 ⁶	3,3 × 10 ⁶	1,7 × 10 ⁶

* Inkubation bei 4°C zwischen der Zugabe von DNA und der Elektroporation.

** Inkubation bei 4°C zwischen der Elektroporation und dem Beginn der Expressionsperiode.

Tabelle 2:

Expression der Tetracyclin Resistenz von pBC 16 nach der Transformation in *B. thuringiensis* HD1 cryB. *B. thuringiensis* HD1 cryB wurde mit pBC16 Plasmid DNA unter Verwendung des erfindungsgemäßen Elektroporationsprotokolls transformiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in LB Medium bei 30°C werden die transformierten Zellen durch Ausplattierung auf LB Agar, der 20 µg/ml Tetracyclin enthält, selektioniert.

Expressionszeit der Tetracyclin-resistenz (Stunden)	Transformationsfrequenz (Transformanten/µg DNA)	Anzahl lebender Zellen
0,5	0	4×10^8
1	$1,6 \times 10^6$	10^9
2	$8,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^9$
3	8×10^6	$1,6 \times 10^9$

Tabelle 3:

Transformation des *B. thuringiensis* Stammes HD1 cryB mit verschiedenen Plasmiden

Plasmid	Herkunft Referenz	Resistenzmarker ¹⁾		Transformationsfrequenz ²⁾
		gram negativ	gram positiv	
natürlich vorkommende Plasmide				
pBC16	<i>B. cereus</i>	-	Tc	$1,9 \times 10^6$
pUB110	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Km, Ble	$3,3 \times 10^6$ *
pC194	<i>S. aureus</i>	-	Cm	6×10^6 *
pIM13	<i>B. subtilis</i>	-	Em	$1,8 \times 10^5$
modifizierte Plasmide/Klonierungsvektoren				
pBD64	pUB110 replicon	-	Km, Cm	5×10^6
pBD347	pIM13 replicon,	-	Cm	$2,9 \times 10^5$
pBD348	pIM13 replicon,	-	Em, Cm	$1,1 \times 10^5$
pUB1664	pUB110 replicon,	-	Cm, Em	$3,5 \times 10^4$
„shuttle“ Vektoren				
pHV33	pBR322/pC194,	Amp, Tc	Cm	< 50*
pK61	pUC8/pBC16,	Amp	Tc	$2,8 \times 10^4$

1 Tc: Tetrazyklin; Km: Kanamycin; Ble: Bleomycin; Cm: Chloramphenicol; Em: Erythromycin.

2 Sämtliche Plasmid DNA stammt aus *B. thuringiensis* HD1 cryB mit Ausnahme von * isoliert von *B. subtilis* LBG4468.

Tabelle 4:

Biotest von *B. thuringiensis* HD1 cryB und HD1 cryB (pXI 93) gegen *Heliothis virescens*.

Sprühgetrocknete sporulierte Kulturen (Sporen und [sofern vorhanden] Protoxinkristalle) wurden in den angegebenen Mengen der Diät von L-1 Larven von *Heliothis virescens* beigemischt.

Konzentration von Sporen und Protoxinkristallen (µg/g Diät)	Mortalität (%) von <i>H. virescens</i> verursacht durch:	
	HD1 cryB	HD1 cryB (pXI93)
200	0	57
100	0	43
50	3	27
25	0	10
12,5	0	0

Tabelle 5:

Transformierbarkeit von Stämmen von *B. thuringiensis*, *B. cereus* und *B. subtilis*. Alle Stämme wurden nach der in Beispiel 1 geschilderten Elektroporationsmethode mit dem Plasmid pBC16 transformiert.

Stamm	Transformations- ¹⁾ Frequenz
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	
HD1 cryB	1
HD1 dipel	0,25
HD1-9	0,9
HD 73	0,1
HD 191	0,5
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>	
HD 2-D6-4	13,8
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	
LBG B-4444	2,6
<i>B. cereus</i>	
569 K	7,5
<i>B. subtilis</i>	
LBG B-4468	0,0002

¹⁾ relative Werte bezogen auf die als 1 definierte Transformationsfrequenz, die mit *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 cryB erzielt wird.

Hinterlegung von Mikroorganismen

Von jedem der im folgenden aufgelisteten Mikroorganismen, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden, wurde eine Kultur bei der als internationale Hinterlegungsstelle anerkannten „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen“ in Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, entsprechend den Anforderungen des Budapester Vertrages für die Internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke der Patentierung, hinterlegt. Eine Erklärung zur Lebensfähigkeit der hinterlegten Proben wurden durch die besagte Internationale Hinterlegungsstelle ausgefertigt.

Hinterlegung von Mikroorganismen

Mikroorganismen	Hinterlegungs- datum	Hinterlegungs- Nummer	Datum der Lebensfähigkeits- bescheinigung
HB 101 (pK36) (<i>E. coli</i> HB101 transformiert mit pK36 Plasmid DNA)	4. März 1986	DSM 3668	7. März 1986
*HD1 cry β (<i>Bacillus thu-</i> <i>ringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD1 cry β)	4. Mai 1988	DSM 4574	4. Mai 1988
*HD1 cry β (*pK 61) (<i>B. thuringiensis</i> HD1 cry β transfor- miert mit *pK 61 Plasmid DNA)	4. Mai 1988	DSM 4572	4. Mai 1988
*HD1 cry β (*pK 93) (<i>B. thuringiensis</i> HD1 cry β transfor- miert mit *pK 93 Plasmid DNA)	4. Mai 1988	DSM 4571	4. Mai 1988
569 K (<i>Bacillus cereus</i> 569 K)	4. Mai 1988	DSM 4575	4. Mai 1988
569 K (*pK 93) (<i>B. cereus</i> 569 K transformiert mit *pK 93 Plasmid DNA)	4. Mai 1988	DSM 4573	4. Mai 1988

Die im Prioritätsdokument für die Benennung der Plasmide gewählte interne Bezeichnung pK wurde für die Auslandsfassung durch die offiziell anerkannte Bezeichnung pXI ersetzt.
Auch die Bezeichnung für die im Rahmen der Ausführungsbeispiele verwendete asporogene *B. thuringiensis* HD1 Mutante wurde von cry β nach cryB geändert.

Literaturverzeichnis

- 1 Goldberg, L., und Margarit, J., *Mosquito News*, 37: 355-358, 1977
- 2 Krieg, A., et al., *Z. Ang. Ent.*, 98: 500-508, 1983
- 3 Schnepf, H.-E., and Whiteley H.-R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2893-2897, 1981
- 4 Klier, A., et al., *The EMBO J*, 1: 791-799, 1982
- 5 Geiser, M., et al., *Gene*, 48: 109-118, 1986
- 6 Haider, M.-Z., et al., *Gene*, 52: 285-290, 1987
- 7 Gonzalez, J.-M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6951-6955, 1982
- 8 Obukowicz, M.-G., et al., *J. Bacteriol.*, 168: 982-989, 1986
- 9 Donovan, L.-P., et al., *Mol. Gen. Genet.*, 214: 365-372, 1988
- 10 Schnepf, H.-E., and Whiteley, H.-R., *J. Biol. Chem.*, 260: 6273, 1985
- 11 Klier, A., et al., *Mol. Gen. Genet.*, 191: 257-262, 1983
- 12 Bibb, J.-J., et al., *Nature*, 274: 398-400, 1978
- 13 Chang, S., and Cohen S.-N., *Molec. Gen. Genet.*, 188: 111-115, 1979
- 14 Brown, B.-J., and Carlton B.-C., *J. Bacteriol.*, 142: 508-512, 1980
- 15 Kondo, J.-K., and McKay, L.-L., *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 252-259, 1984
- 16 Wirth, R., et al., *J. bacteriol.*, 165: 831-836, 1986
- 17 Yoshihama, M., et al., *J. Bacteriol.*, 162: 591-597, 1985
- 18 Alikhanian, S.-J., et al., *J. Bacteriol.*, 146: 7-9, 1981
- 19 Martin, P.-A., et al., *J. Bacteriol.*, 145: 980-983, 1981
- 20 Fischer, H.-M., *Arch. Microbiol.*, 139: 213-217, 1984
- 21 Schall, D., Genübertragung zwischen Isolaten von *Bacillus thuringiensis* durch Protoplastentransformation und -fusion. Dissertation, Universität Tübingen, 1986
- 22 Shivarova, N., *Zeitschr. Allgem. Mikrobiol.*, 23: 595-599, 1983
- 23 Youston, A.-A., und Rogoff, M.-H., *J. Bacteriol.*, 100: 1229-1236, 1969
- 24 Horinouchi, S., and Weisblum, B., *J. Bacteriol.*, 150: 815-825, 1982
- 25 Polak, J., and Novick, R.-P., *Plasmid*, 7: 152-162, 1982
- 26 Mahler, J., and Halvorson, H.-O., *J. Gen. Microbiol.*, 120: 259-263, 1980
- 27 Gryczan, T., et al., *J. Bacteriol.*, 141: 246-253, 1980
- 28 Vieira, J., and Messing, J., *Gene*, 19: 259-268, 1982
- 29 Wong, et al., *J. Biol. Chem.*, 258: 1960-1967, 1983
- 30 Bolivar, et al., *Gene* 2: 95-113, 1977
- 31 Norrander et al., *Gene*, 26: 101-1904, 1983
- 32 Bevan, et al., *Nature*, 304: 184-187, 1983
- 33 Maniatis et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA, 1982
- 34 Hinnen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1929-1933, 1978
- 35 Young RA et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80: 1194-1198, 1983
- 36 Huber-Lucač, M., „Zur Interaktion des delta-Endotoxins von *Bacillus thuringiensis* mit monoklonalen Antikörper und Lipiden“, Dissertation Nr. 7547, ETH Zürich, 1984
- 37 Huber-Lucač, M., et al., *Infect. Immunol.*, 54: 228-232, 1986
- 38 McCutcheon's, 1986 *International McCutcheon's Emulsifiers & Detergents*, The Manufacturing Confections Publishing Co., Glen Rock, NJ, USA
- 39 Stahly, D.P., et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 84: 581-588, 1978
- 40 Bernhard, K., et al., *J. Bacteriol.*, 133: 897-903, 1978
- 41 Primrose, S.-B., Ehrlich, S.-D., *Plasmid* 6: 193-201, 1981
- 42 Huber-Lukac, H., Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Schweiz, No. 7050, 1982
- 43 Zoller, J.-M. and Smith, M., *Nucl. Acids Res.*, 10: 6487, 1982
- 44 Miller, J.-H., *Experimente in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972
- 45 Shulman et al., *Nature*, 276: 269, 1978
- 46 Towbin, H., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75: 4350-4354, 1979

Patentliteratur

- EP 162,725
EP 238,441
WO 86/01536
US-P 4,448,885
US-P 4,447,036
US-P 4,237,224
US-P 4,468,464

Fig. 1

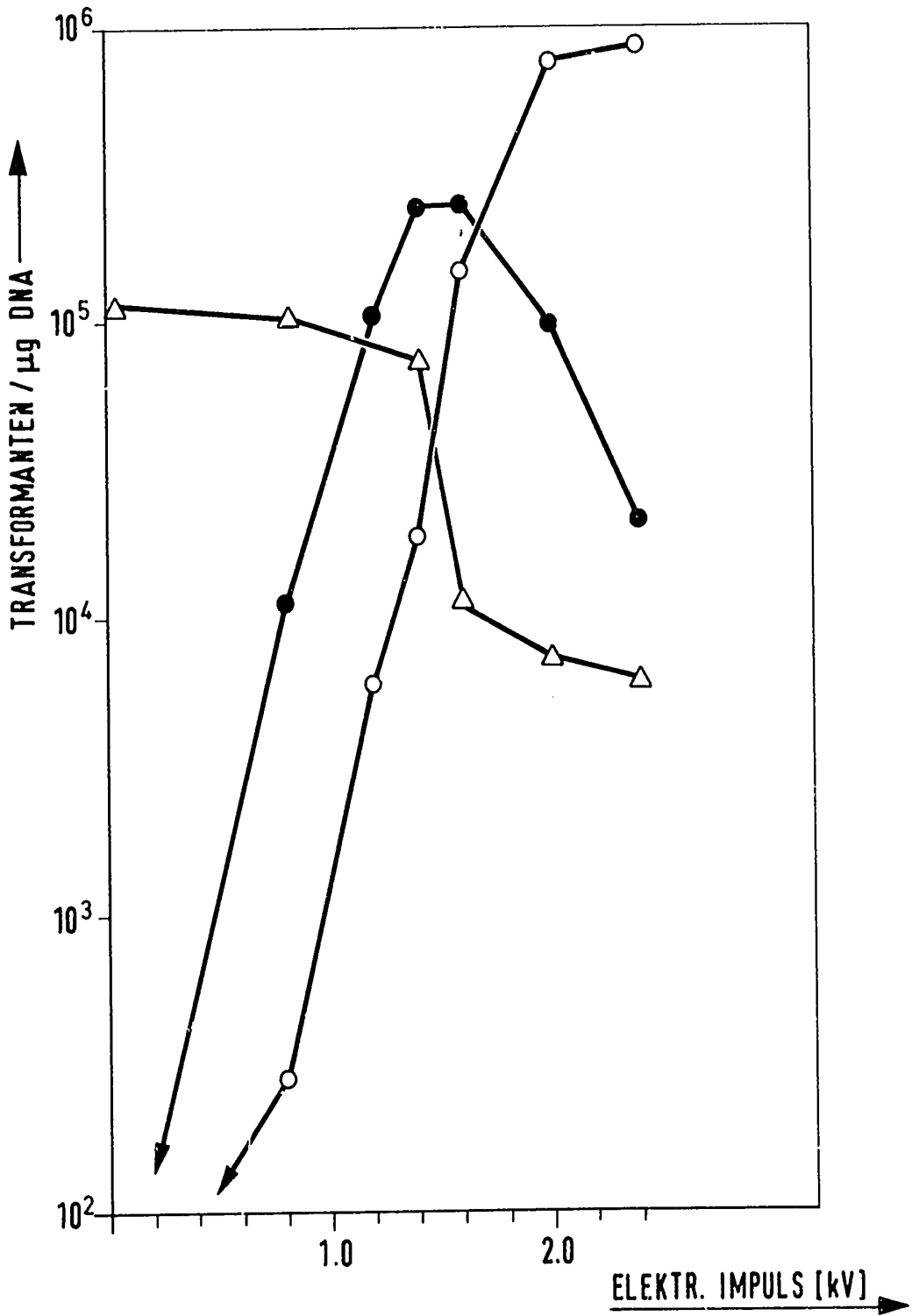


Fig. 2

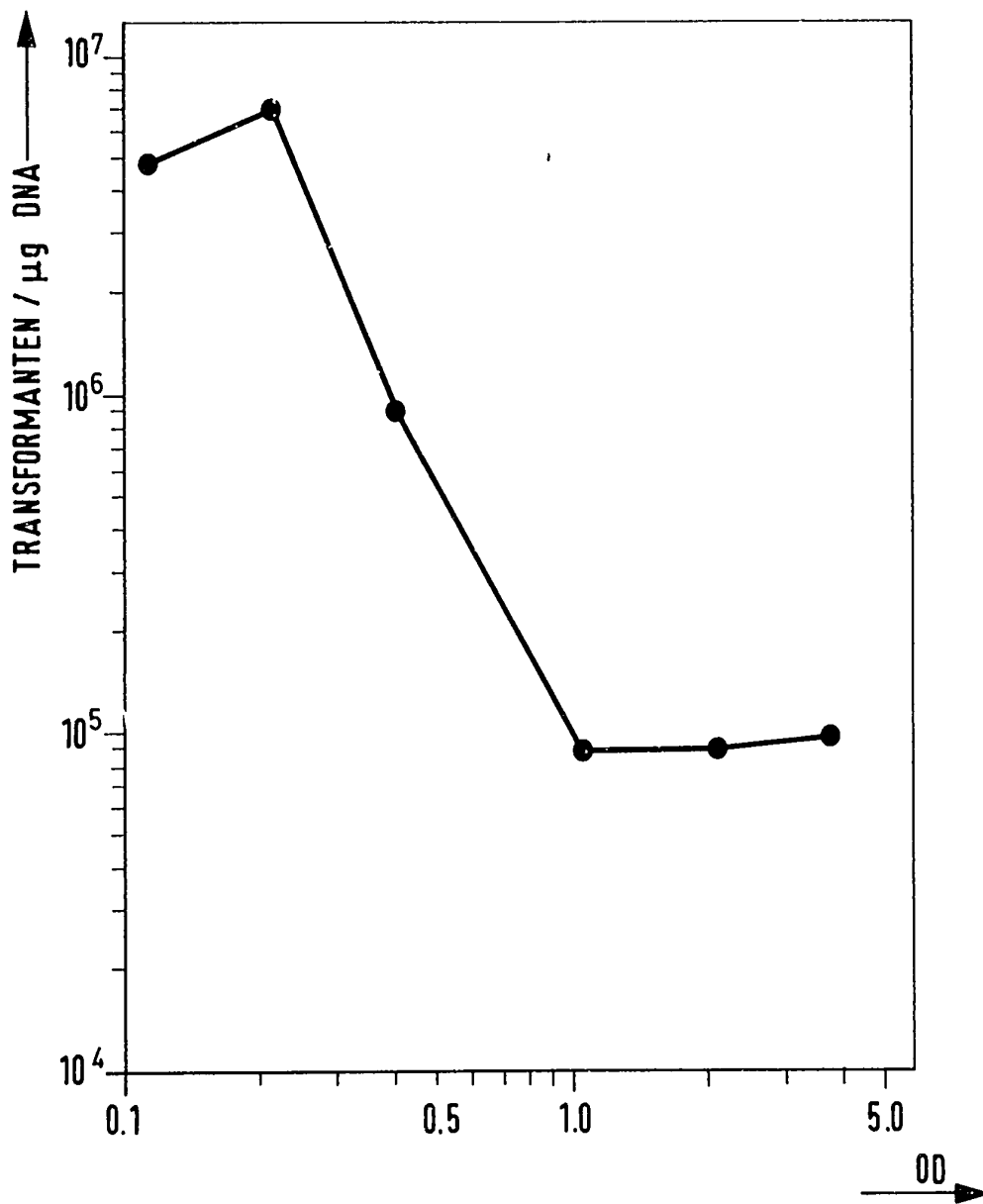


Fig: 3

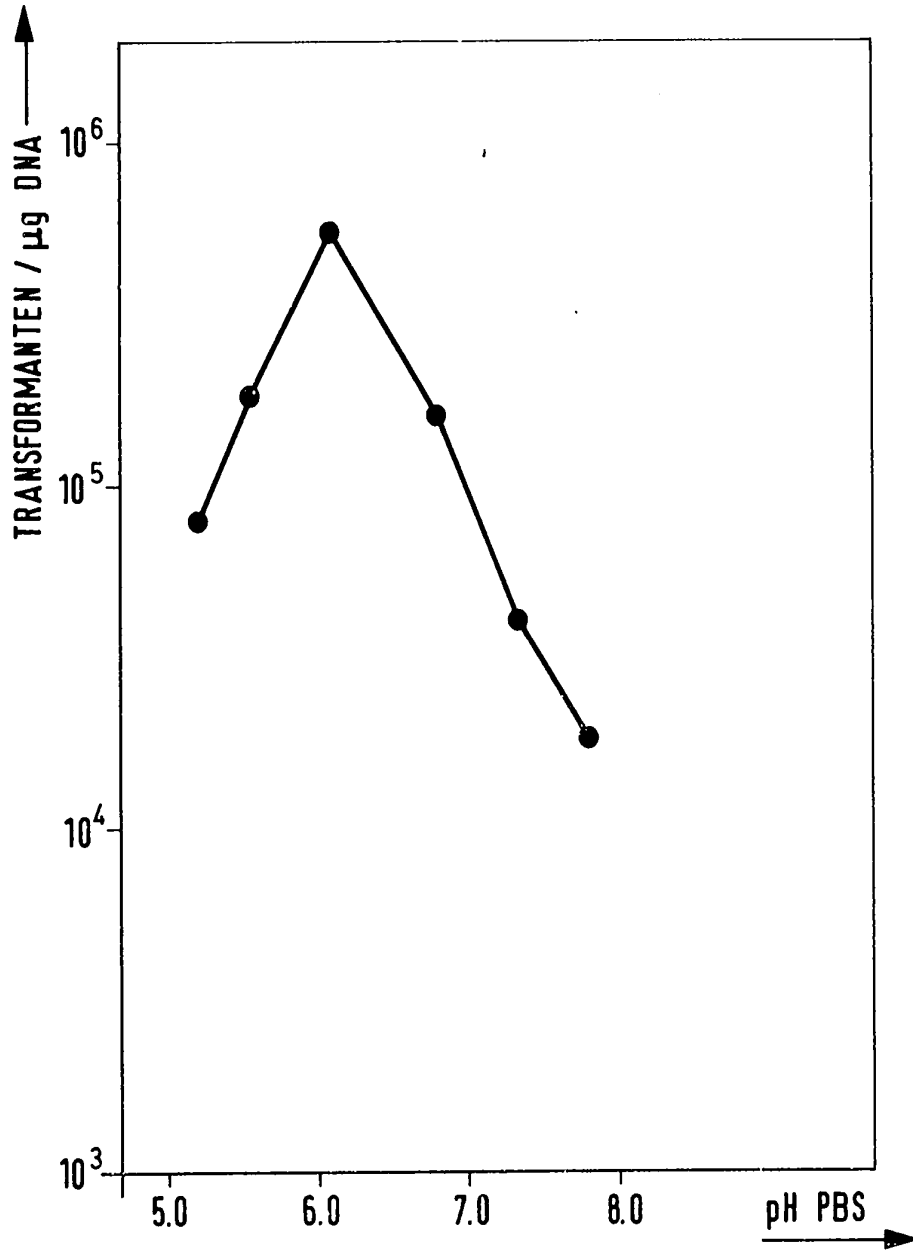
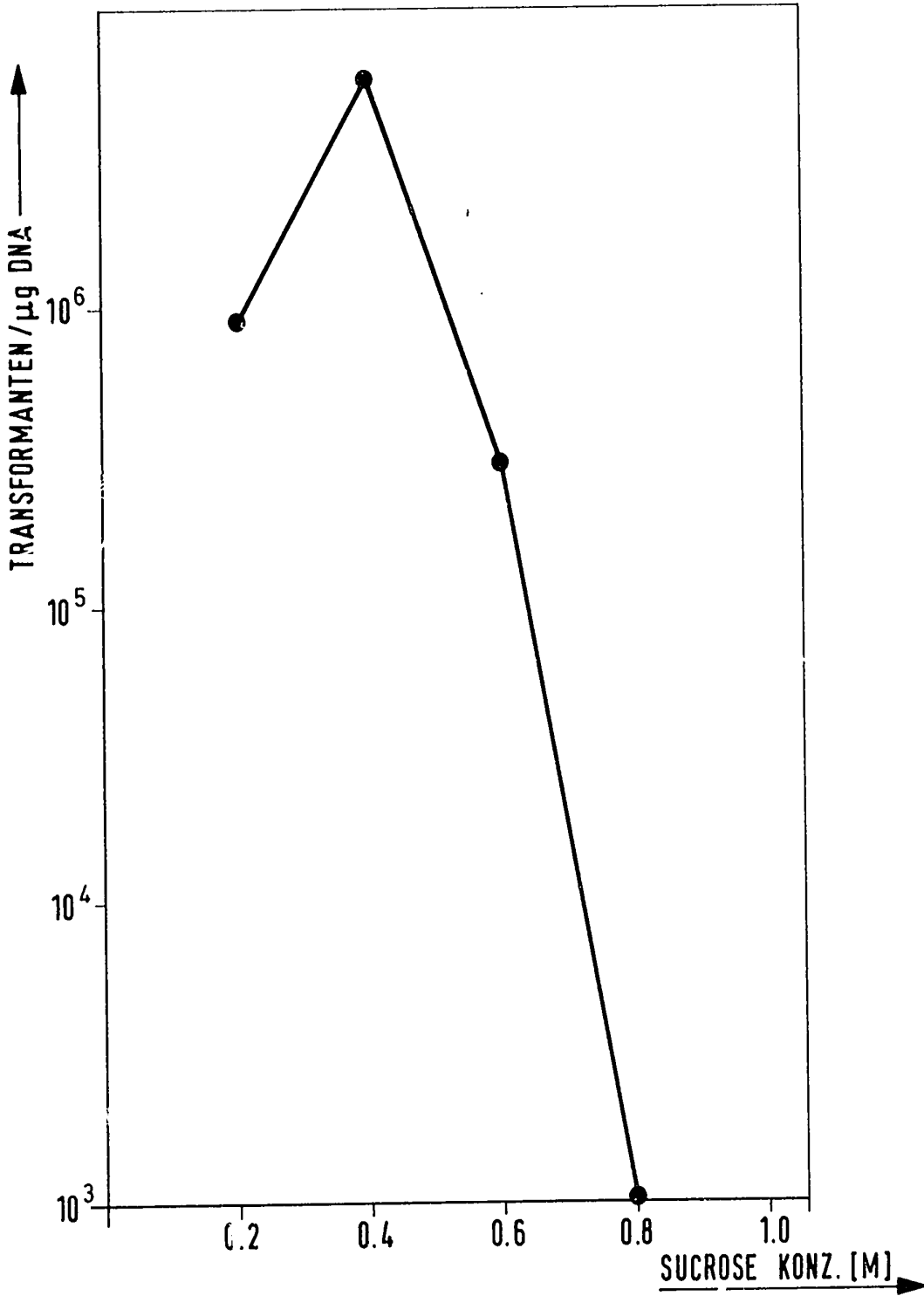


Fig. 4



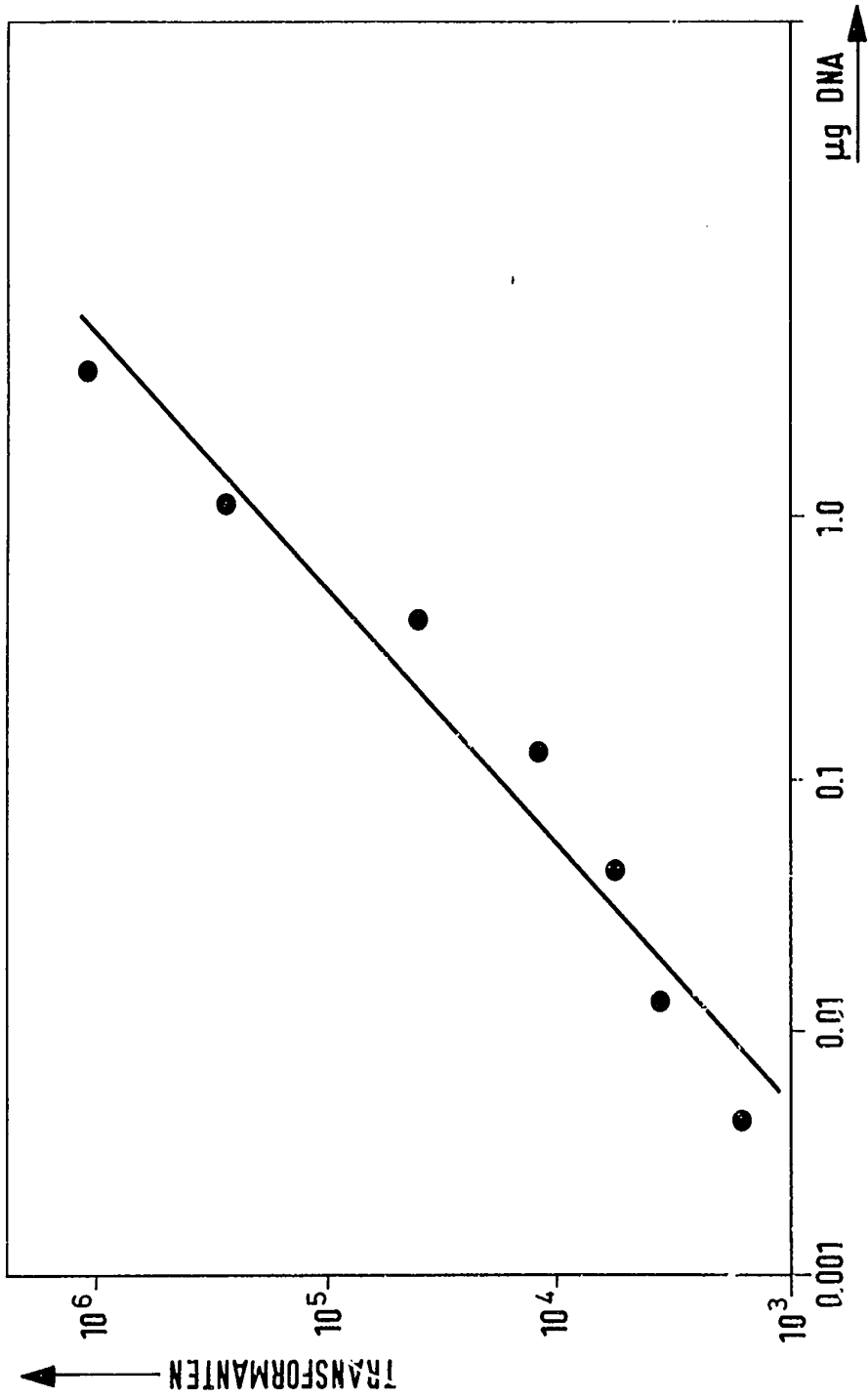


Fig. 5

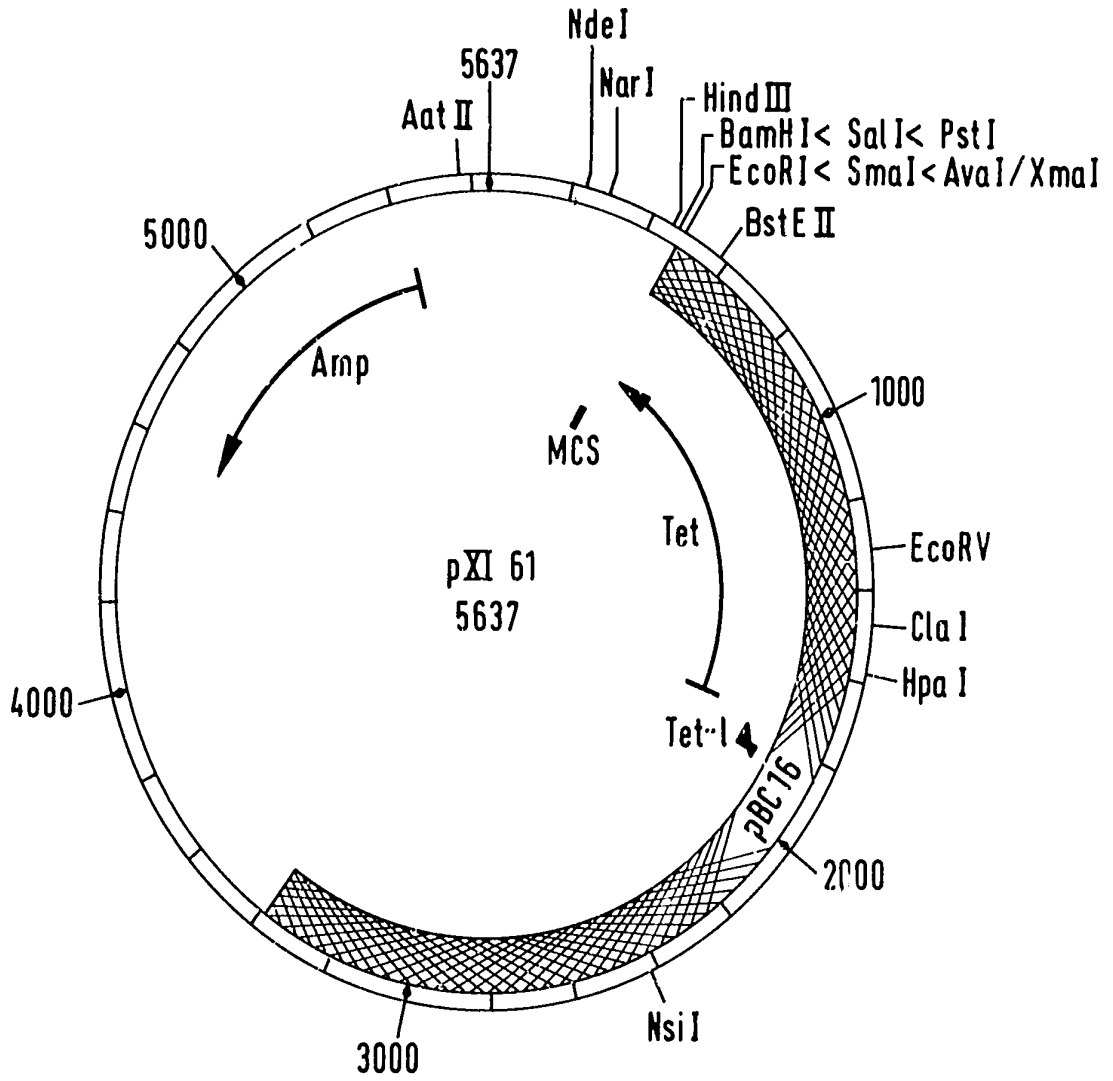


Fig. 6

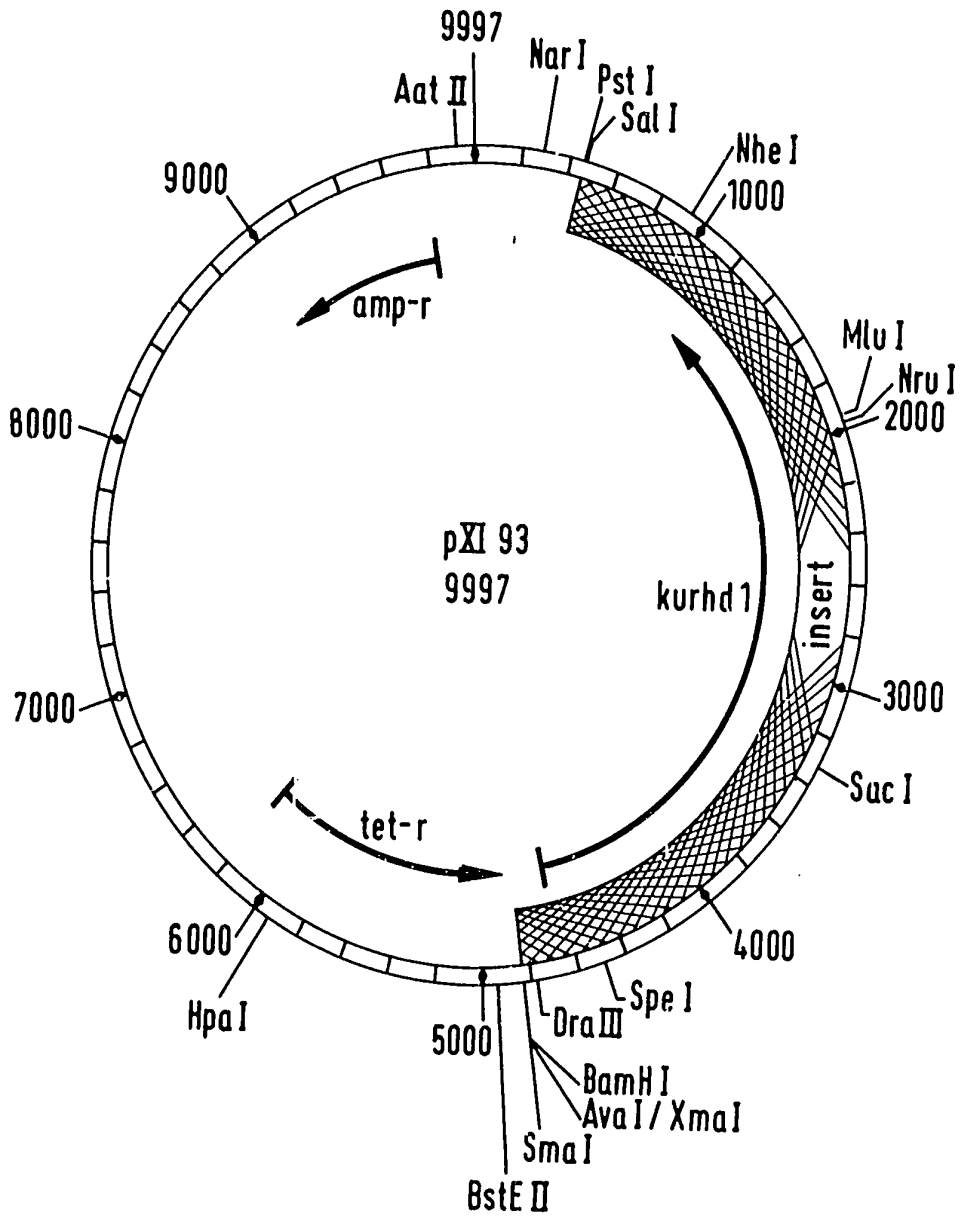


Fig. 7

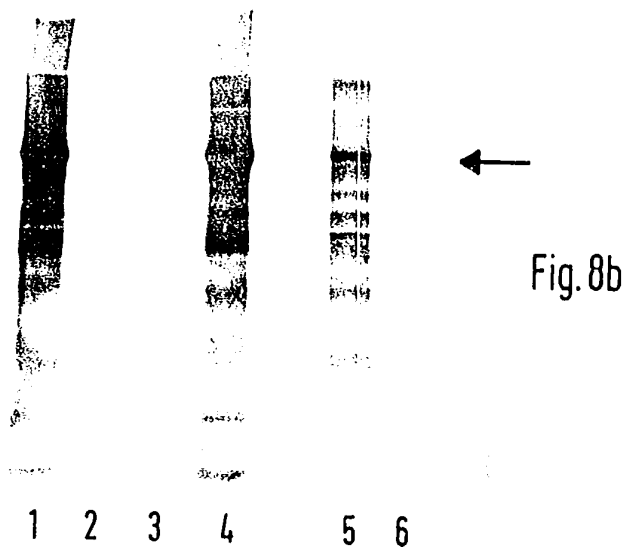
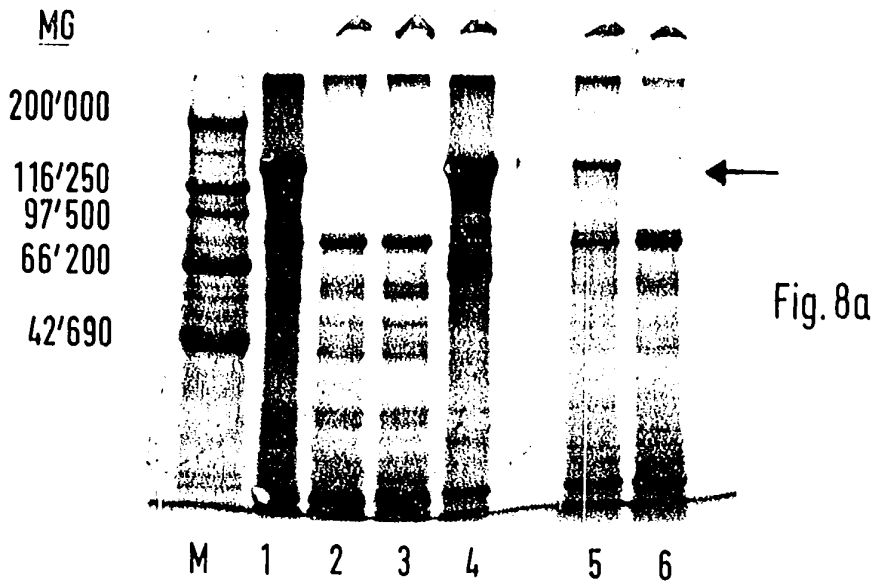


Fig. 9

